槲皮素通过 NLRP 炎症小体相关通路对顺铂诱导肝损伤的保护作用

陈冬琳[1]，刘煜[2*]，纪翠芳[1]，符青[2]，黄丽云[2](1.中南大学湘雅医学院附属海口医院药学部，海口 570208；2.海南医学院第一附属医院药学部，海口 570102)

摘要：目的 探讨槲皮素通过 NLRP 炎症小体相关通路对顺铂诱导肝损伤的保护作用及其生物学机制。**方法** 在顺铂处理之前给小鼠灌胃槲皮素；通过血清生化分析和肝组织病理学分析检查小鼠的肝损伤情况；通过 Western blotting 检测凋亡相关蛋白和 NLRP3 炎症小体相关蛋白的变化。**结果** 槲皮素可通过抑制血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶水平升高，恢复肝脏组织病理学改变，从而有效防治顺铂诱导的肝损伤。同时，槲皮素可以明显抑制氧化应激相关因子的产生，降低肝细胞凋亡，降低 Bax、Bad、裂解的 caspase-3 和增加 Bcl-2 表达。此外，NLRP3 炎性小体途径在槲皮素的作用下被灭活。**结论** 槲皮素可以抑制顺铂诱导的小鼠肝损伤，可能是通过调节 NLRP3 炎症小体相关途径来实现的。

关键词：槲皮素；NLRP 炎症小体；顺铂；肝损伤

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2021)17-2105-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.17.009

引用本文：陈冬琳，刘煜，纪翠芳，等. 槲皮素通过 NLRP 炎症小体相关通路对顺铂诱导肝损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(17): 2105-2109.

Protective Effect of Quercetin on Cisplatin-induced Liver Injury Through NLRP Inflammatory Body Related Pathway

CHEN Donglin[1], LIU Yu[2*], JI Cuifang[1], FU Qing[2], HUANG Liyun[2](*1.Department of Pharmacy, Haikou Hospital, Xiangya Medical College, Central South University, Haikou 570208, China; 2.Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the protective effect and biological mechanism of quercetin on cisplatin-induced liver injury through the NLRP inflammatory body related pathway. **METHODS** Before cisplatin treatment, mice were chronically administered with quercetin; the liver injury of mice was examined by serum biochemical analysis and liver histopathological analysis; the changes of apoptosis-related protein and NLRP3 inflammatory body-related protein were detected by Western blotting. **RESULTS** Quercetin could effectively prevent levels of serum alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase and restoring liver histopathological changes, thereby effectively preventing liver injury injected by cisplatin. At the same time, quercetin could significantly inhibit the production of oxidative stress-related factors, reduce hepatocyte apoptosis, reduce Bax, Bad, cleaved caspase-3 and increase Bcl-2 expression. In addition, the NLRP3 inflammatory corpuscle pathway was inactivated by quercetin. **CONCLUSION** Quercetin inhibits cisplatin-induced liver injury in mice, which may be related to regulating NLRP3 inflammatory body-related pathways.

KEYWORDS: quercetin; NLRP inflammatory body; cisplatin; liver injury

在传统的肿瘤治疗方法中，化学疗法最为常见。但是，化疗药物普遍具有不良反应，这些不良反应可能导致患者依从性和生活质量的降低。不良反应的主要原因之一是活性氧(reactive oxygen species，ROS)的产生[1-2]。顺铂是用于治疗各种实体瘤的最为有效的药物之一[3]。然而其临床使用受到许多不良反应的限制，例如肝毒性、神经毒性、肾毒性、胃肠道毒性、卵巢和子宫毒性[4]。目前尚不完全了解顺铂生物学毒性的确切机制，最可能的解释是由于 ROS 的形成激活了促炎细胞因子[5]。槲皮素是生物类黄酮的衍生物，具有抗炎、抗过敏、抗病毒和抗肿瘤的特性，同时，是一种强抗氧化剂，可降低 ROS 的影响[6]。本研究旨在通过组织病理学和分子生物学方法，研究槲皮素对顺铂导致的小鼠肝损伤是否具有保护作用及其潜在机制。

1　材料和方法

1.1　动物

C57BL/6 小鼠♂(8~12 周龄)，32 只，购自上海吉辉实验动物饲养有限公司，动物生产许可证号：SCXK(沪)2017-0013；动物实验在上海交通大学进行，动物使用许可证号：SYXK(沪)2018-0028；该

作者简介：陈冬琳，女，主管药师　Tel: 13807562915　E-mail: lnd452@163.com　***通信作者：**刘煜，男，硕士，副主任药师　Tel: 13647540063　E-mail: 280093515@qq.com

动物质量合格证号：2018-0028330572。实验前将小鼠在可控制的环境中[(21±2) ℃，光照/黑暗周期 12 h]放置至少 1 周以适应环境。所有动物实验均根据《美国国立卫生研究院医疗保健指南》进行。本研究得到上海市人民医院动物实验伦理委员会的批准。

1.2 仪器和试剂

7080 自动生化分析仪(HITACHI)；BX51T-PHD-J11 相差显微镜(Olympus)。HE 试剂盒(批号：20200907)、BCA 试剂盒(批号：20200702)均购自南京建成生物工程研究所；谷丙转氨酶(alanine aminotransferase，ALT)试剂盒(批号：20210105)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase，AST)试剂盒(批号：20201230)均购自长春汇力生物；聚偏二氟乙烯膜(Bio-Rad，批号：20190301)；抗 NLRP3(批号：20200930)、ASC(批号：20200209)、caspase-1(批号：20200701)、Bax(批号：20201102)、Bcl-2(批号：20201029)、Cleaved caspase-3(批号：20191230)、caspase-3(批号：20210204)均购自 Abcam；辣根过氧化物酶二抗偶联的抗体(批号：20190906)、化学发光检测试剂盒(批号：20190201)均购自 Santa Cruz。

1.3 分组

根据产品方案，将槲皮素以 10 mg·mL^{-1}的浓度溶于无菌 0.9%的氯化钠溶液中，制成槲皮素溶液。随后将实验用小鼠随机分配到以下 4 组：①对照组，小鼠每天 1 次 0.2 mL 生理盐水灌胃，持续 14 d。②槲皮素组，小鼠每天 1 次 0.2 mL 槲皮素溶液灌胃给药，持续 14 d。③顺铂组，参照 Niu 等[7]的方法，小鼠以 40 mg·kg^{-1}体质量单次注射顺铂，以诱导肝损伤模型。④顺铂+槲皮素组，小鼠以 40 mg·kg^{-1}体质量单次注射顺铂，随后每天 1 次 0.2 mL 槲皮素溶液灌胃给药，持续 14 d。所有小鼠均轻度麻醉，并在最后一次口服槲皮素(或生理盐水)24 h 后颈脱位法处死。收集肝脏组织和血液样本以进行分析。

1.4 血清生化参数和氧化应激因子。

将血样在 4 ℃下以 3 000 r·min^{-1}离心 15 min 以获取血清。用自动生化分析仪测定肝丙二醛(malondialdehyde，MDA)、ROS、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase，GSH-Px)和血清总胆红素(total bilrubin，TBil)的含量。

1.5 肝组织病理学评估

进行 HE 染色以确定肝损伤程度。处死小鼠后，解剖肝脏标本并立即固定在 4%多聚甲醛中。然后将肝样品包埋在石蜡中，切成 4 μm 厚的切片，并用 HE 试剂盒染色，通过显微镜观察图像。肝损伤的组织学严重程度根据 Suzuki 的标准以 0~4 的评分标准进行评分[8]。

1.6 Western blotting 检测相关蛋白表达水平

小鼠肝脏组织匀浆中加入蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液提取蛋白质。用 BCA 试剂盒检测蛋白质浓度，并将相同量的蛋白质在 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中电泳，电转移到聚偏二氟乙烯膜上，用 5%脱脂牛奶封闭 2 h。随后，将膜与抗 NLRP3、ASC、caspase-1、Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3、caspase-3 的一抗孵育，在 4 ℃下过夜，然后与辣根过氧化物酶二抗偶联的抗体在室温下孵育 1 h。使用化学发光检测试剂盒将条带可视化。并对蛋白含量进行了半定量分析。

1.7 TUNEL 测定肝细胞凋亡

采用 TUNEL 法检测肝细胞凋亡。将厚度为 4 μm 的石蜡切片去石蜡，并用 0.1%TritonX-100 处理 8 min。用 PBS 洗涤 2 次后，将切片与 TUNEL 反应混合物在室温下孵育 1 h，然后与 DAPI 孵育 10 min。在荧光显微镜下观察 TUNEL 阳性细胞。

1.8 统计学分析

使用 GraphPad Prism 5 和 SPSS 20.0 进行统计分析。数据表示为 $\bar{x} \pm s$。多组数据比较用方差分析。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对顺铂诱导的急性肝损伤的作用

首先评估槲皮素对顺铂诱导的急性肝损伤的作用。在对照组和槲皮素组，小鼠肝脏结构正常，而顺铂组肝脏则表现出严重的炎症细胞浸润，肝细胞坏死和空泡形成，应用槲皮素后上述情况得到部分恢复，Suzuki 评分结果也显示了相同的趋势。同时，采用血清 ALT 和 AST 水平作为肝功能的评价指标。与对照组相比，顺铂组的 ALT 和 AST 水平均显著增加(P<0.001)。与顺铂组相比，顺铂+槲皮素组的血清 ALT 和 AST 水平显著降低(P<0.01)。这些结果表明槲皮素对顺铂诱导的急性肝损伤具有保护作用。结果见图 1。

2.2 槲皮素对小鼠氧化应激的影响

为了评估槲皮素对肝脏抗氧化能力的影响，

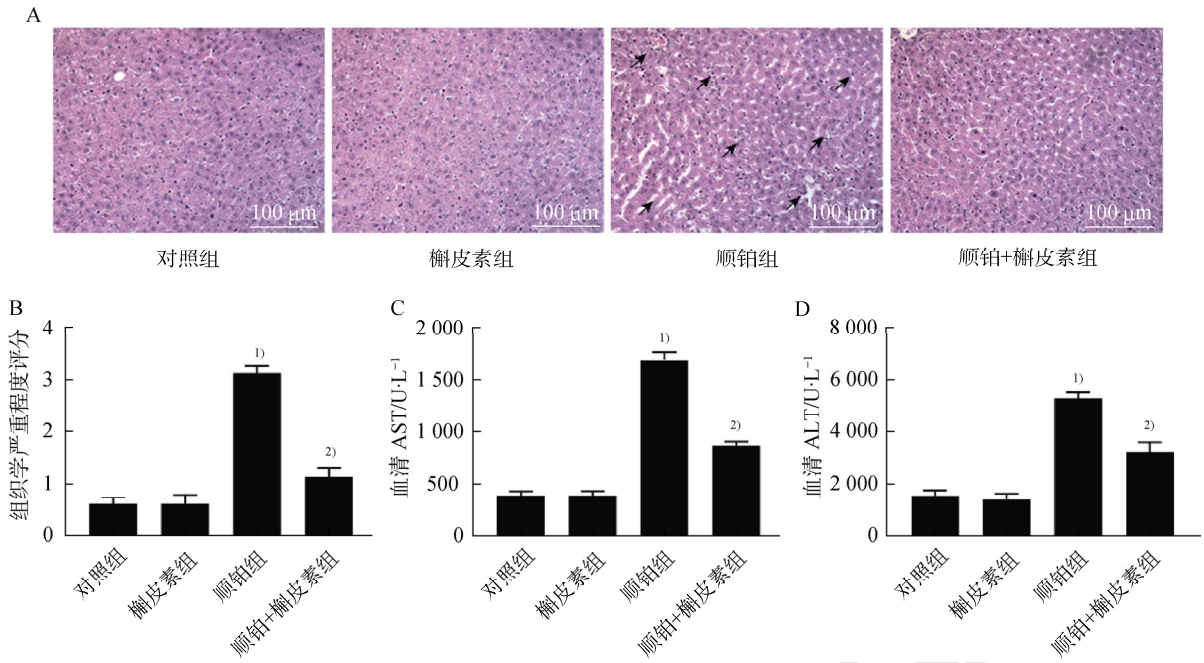

图 1 槲皮素对顺铂诱导的小鼠肝损伤的影响($\bar{x}\pm s$，n=8)

A–HE 染色(40×)；B–肝脏损伤的组织学严重程度评分；C–血清 AST 水平；D–血清 ALT 水平；与对照组比较，$^{1)}P$<0.001；与顺铂组比较，$^{2)}P$<0.01。

Fig. 1 Effect of quercetin on liver injury induced by cisplatin in mice($\bar{x}\pm s$, n=8)

A–HE staining(40×); B–histological severity score of liver injury; C–serum AST levels; D–serum ALT levels; compared with control group, $^{1)}P$<0.001; compared with cisplatin group, $^{2)}P$<0.01.

本研究检测了氧化应激引起的肝损伤标志物，包括肝组织中 MDA、ROS、GSH-Px 和血清 TBil。与对照组相比，顺铂组的 MDA 和 ROS 含量均增加(P<0.001)，而 GSH-Px 和 TBil 均降低(P<0.001)，而应用槲皮素可以有效恢复；与顺铂组相比，顺铂+槲皮素组 MDA、ROS 显著降低(P<0.01)，GSH-Px、TBil 显著升高(P<0.01)。结果表明，槲皮素对顺铂诱导的肝损伤具有明显的氧化应激抑制作用。结果见图 2。

2.3 槲皮素对小鼠肝细胞凋亡的影响

肝细胞凋亡是急性肝损伤早期的病理特征[9]。因此，进一步评估槲皮素的给药是否可以保护小鼠的肝细胞凋亡。TUNEL 染色结果表明，正常和槲皮素组小鼠肝脏中很少出现肝细胞凋亡，顺铂诱导的小鼠肝细胞凋亡的细胞数量显著增加，而槲皮素的给药则降低了肝细胞凋亡，结果见图 3A。同时，Western blotting 结果表明，槲皮素给药可显著抑制 Bax 和 Cleaved-caspase3 的表达，同时抑制 Bax 的表达，结果见图 3B。这些结果表明槲皮素可以保护顺铂诱导的肝损伤小鼠的肝细胞凋亡。

2.4 槲皮素顺铂诱导的急性肝损伤中 NLRP 炎症小体相关通路的影响

为了进一步了解槲皮素在顺铂诱导的急性肝损伤中发挥保护作用的潜在机制，本研究通过 Western blotting 检测了 NLRP 炎症小体相关通路。结果显示顺铂的刺激显著激活了 NLRP 炎症小体

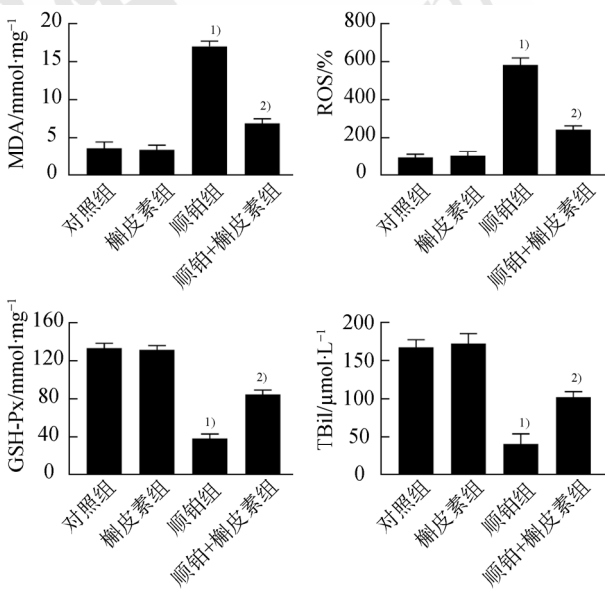

图 2 槲皮素对顺铂诱导的肝损伤中氧化应激指标的影响($\bar{x}\pm s$，n=8)

与对照组比较，$^{1)}P$<0.001；与顺铂组比较，$^{2)}P$<0.01。

Fig. 2 Effect of quercetin on oxidative stress in cisplatin-induced liver injury($\bar{x}\pm s$, n=8)

Compared with control group, $^{1)}P$<0.001; compared with cisplatin group, $^{2)}P$<0.01.

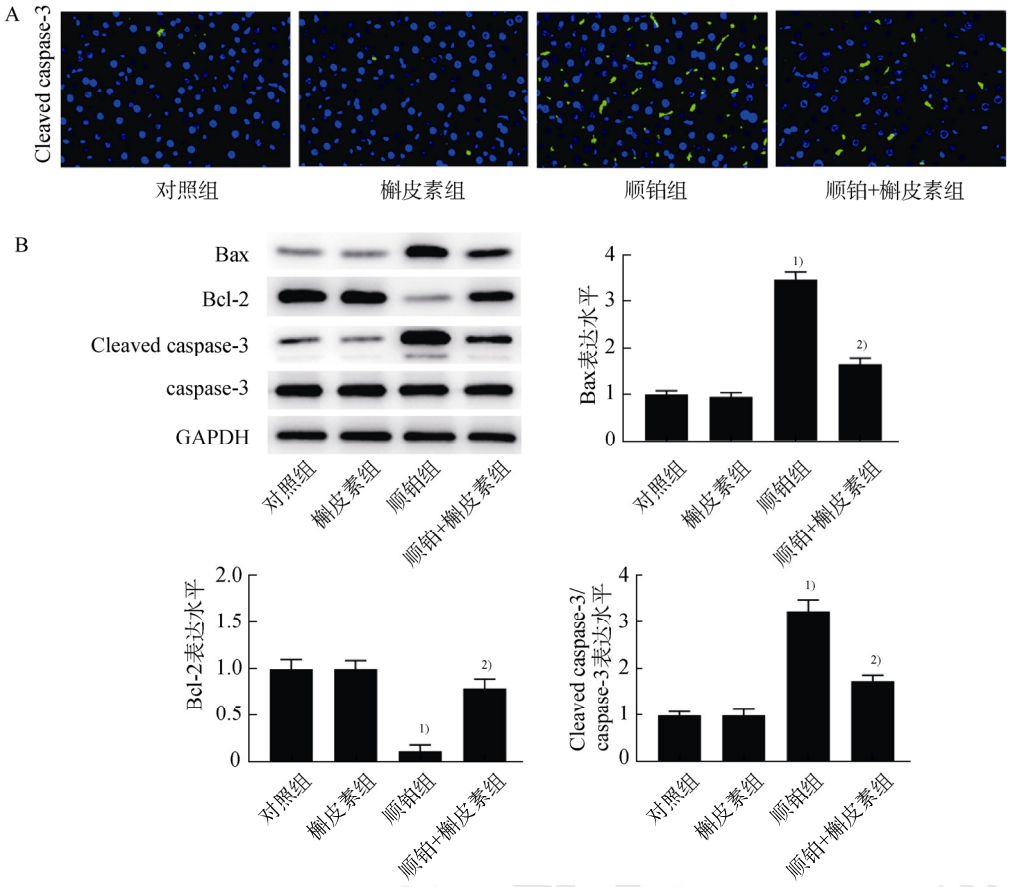

图 3 槲皮素对顺铂诱导的小鼠肝损伤后肝细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$，n=8)

A–肝细胞凋亡；B–凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3 和 caspase-3 水平以及蛋白含量定量；与对照组比较，$^{1)}P$<0.001；与顺铂组比较，$^{2)}P$<0.01。

Fig. 3 Effect of quercetin on hepatocyte apoptosis after cisplatin-induced liver injury in mice($\bar{x}\pm s$, n=8)

A–hepatocyte apoptosis; B–apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2, Cleaved caspase-3 and caspase-3, and to quantify the relative protein content; compared with control group, $^{1)}P$<0.001; compared with cisplatin group, $^{2)}P$<0.01.

相关通路的信号传导，与顺铂组相比，顺铂+槲皮素组小鼠肝脏中 NLRP3、ASC 和 caspase-1 的蛋白表达显著增加(P<0.01)。结果见图 4。应用槲皮素后相对缓解了上述变化，槲皮素显著降低了 NLRP 炎症小体信号传导途径的活性。实验结果表明，槲皮素抑制顺铂诱导的急性肝损伤中 NLRP 炎症小体相关通路的激活。

3 讨论

化疗药物顺铂会减弱人体的正常体内平衡。在正常的临床治疗期间，氧化应激在顺铂诱导的不良反应中起主要作用，从而导致剂量限制和临床疗效欠佳[10]。类黄酮是植物中主要的活性营养成分。与酚类化合物一样可以用作有效的抗氧化剂和金属螯合剂。槲皮素是一种强抗氧化剂，可降低 ROS 的影响[11]。同时，槲皮素还具有抗肿瘤细胞增殖作用[12]。但是，尚无报道显示槲皮素对顺铂所致急性肝损伤的作用。本研究结果表明，槲皮素通过抑制炎症损伤，氧化应激和肝细胞凋亡对急性肝损伤起到保护作用，如降低氧化应激、减缓 DNA 损伤、降低促凋亡因子(Bax、caspase-3)以及增加抗凋亡因子(Bcl-2)表达。这些结果表明槲皮素可以通过半胱天冬酶依赖性信号通路保护细胞凋亡。众所周知，NLRP3 炎性小体和 TLR4/NF-κB 途径参与了顺铂诱导的炎症反应，并且与急性肝损伤的发病机制有关[13]。NLRP3 炎性小体在调节中起重要作用，主要是通过激活促炎细胞因子来消除炎症反应[14]。激活后，NLRP3 募集衔接子 ASC，后者又募集 pro-caspase-1，从而导致生物活性 IL-1β 和 IL-18 的成熟和释放[15]。这些结果与本研究中显示的结果一致，即槲皮素具有潜在的抗氧化能力，可以增强顺铂诱导的肝损伤对氧化应激的抵抗力。从以上结果可以看出，槲皮素可以抑制 NLRP3 炎性小体相关通路，减轻炎症反应和炎症和氧化应激的发生，增强了对顺铂所致肝损伤的抵抗力。

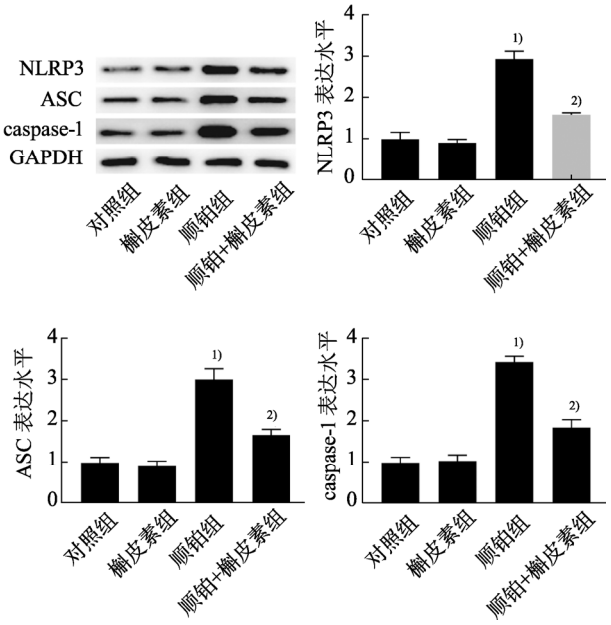

图 4 槲皮素对顺铂所致肝损伤中 NLRP 炎症小体相关通路的影响($\bar{x}\pm s$，n=8)

与对照组比较，[1)]P<0.001；与顺铂组比较，[2)]P<0.01。

Fig. 4 Effect of quercetin on NLRP inflammatory corpuscle-related pathways in cisplatin-induced liver injury ($\bar{x}\pm s$, n=8)

Compared with control group, [1)]P<0.001; compared with cisplatin group, [2)]P<0.01.

综上所述，本研究揭示了槲皮素对顺铂引起的急性肝损伤的保护作用。结果表明，槲皮素可通过抑制 NLRP3 炎性体小体通路的活性来改善组织损伤程度，下调肝细胞凋亡，炎症和氧化应激。这些结果显示，槲皮素有潜力作为治疗急性肝损伤的保肝剂。

REFERENCES

[1] SINGH K, BHORI M, KASU Y A, et al. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity-Exploring the armoury of obscurity[J]. Saudi Pharm J, 2018, 26(2): 177-190.

[2] LIU F R, LI W F, SHI M D, et al. Effect of baicalin on cell damage induced by cigarette smoke extract[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(5): 391-395.

[3] JANG H, LEE O H, LEE Y, et al. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary[J]. J Pineal Res, 2016, 60(3): 336-347.

[4] SARIBAS G S, ERDOGAN D, GOKTAS G, et al. Examining the protective effects of acetyll-carnitine on cisplatin-induced uterine tube toxicity[J]. J Obstet Gynaecol, 2016, 36(8): 1086-1092.

[5] PANDIR D, KARA O, KARA M. Protective effect of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) on cisplatin induced ovarian damage in rat[J]. Cytotechnology, 2014, 66(4): 677-685.

[6] FUJIMOTO C, YAMASOBA T. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of hearing loss: A systematic review[J]. Antioxidants(Basel), 2019, 8(4): E109. Doi: 10.3390/antiox 8040109.

[7] NIU C W, MA M, HAN X, et al. Hyperin protects against cisplatin-induced liver injury in mice[J]. Acta Cir Bras, 2017, 32(8): 633-640.

[8] CHEN L, REN F, ZHANG H, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3β ameliorates D-GalN/LPS-induced liver injury by reducing endoplasmic reticulum stress-triggered apoptosis[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45202. Doi: 10.1371/journal. pone. 0045202.

[9] CRAIG D G, LEE P, PRYDE E A, et al. Circulating apoptotic and necrotic cell death markers in patients with acute liver injury[J]. Liver Int, 2011, 31(8): 1127-1136.

[10] CHEN Y Z, ZHANG L, LIU Y J, et al. Preparation of PGA-PAE-micelles for enhanced antitumor efficacy of cisplatin[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10(30): 25006-25016.

[11] MIDDLETON E J, KANDASWAMI C, THEOHARIDES T C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer[J]. Pharmacol Rev, 2000, 52(4): 673-751.

[12] MURAKAMI A, ASHIDA H, TERAO. Multitargeted cancer prevention by quercetin[J]. Cancer Lett, 2008, 269(2): 315-325.

[13] TSAI T H, TAM K, CHEN S F, et al. Deletion of caveolin-1 attenuates LPS/GalN-induced acute liver injury in mice[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(11): 5573-5582.

[14] LI Y, LI J, LI S S, et al. Curcumin attenuates glutamate neurotoxicity in the hippocampus by suppression of ER stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in a manner dependent on AMPK[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 286(1): 53-63.

[15] ZHOU R, YAZDI A S, MENU P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation[J]. Nature, 2011, 469(7329): 221-225.

收稿日期：2020-09-21

(本文责编：沈倩)