

## 槲皮素对大鼠酒精性脂肪肝核转录因子表达的影响

张 禁, 谭诗云, 蒋 琳, 朱卫芳, 程景辉

张禁, 谭诗云, 朱卫芳, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060  
蒋琳, 武汉大学人民医院检验科 湖北省武汉市 430060  
程景辉, 湖北省嘉鱼县人民医院内科 437200  
张禁, 武汉大学人民医院硕士, 主要从事脂肪肝防治研究。  
通讯作者: 谭诗云, 430060, 湖北省武汉市武昌区解放路238号, 武汉大学人民医院消化内科. tanshiyun@medmail.com.cn  
电话: 027-88041919-2135  
收稿日期: 2007-04-02 修回日期: 2007-07-21

### Effects of quercetin on the expression of nuclear factor kappaB in alcoholic fatty liver of rats

Jin Zhang, Shi-Yun Tan, Lin Jiang, Wei-Fang Zhu, Jing-Hui Cheng

Jin Zhang, Shi-Yun Tan, Wei-Fang Zhu, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Lin Jiang, Department of Laboratory, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China  
Jing-Hui Cheng, Department of Medicine, Renmin Hospital of Jiayu Country, Jiayu 437200, Hubei Province, China  
Correspondence to: Shi-Yun Tan, Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, 238 Jiefang Road, Wuchang District, Wuhan 430060, Hubei Province, China. tanshiyun@medmail.com.cn  
Received: 2007-04-02 Revised: 2007-07-21

### Abstract

**AIM:** To explore the effect and possible mechanism of quercetin on alcoholic fatty liver (AFL) in rats.

**METHODS:** Forty-eight male wistar rats were randomly divided into four groups: normal control, model, quercetin and naloxone groups. By the end of the fourth week, all rats were weighed, narcotized, sacrificed, and tested for expression levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in plasma. Liver samples were analyzed for common histopathological changes and the expression of nuclear factor kappaB (NF- $\kappa$ B) was measured by immunohistochemical staining.

**RESULTS:** Levels of AST, ALT, and TNF- $\alpha$  in

plasma were markedly lower in the quercetin and naloxone groups than the model group (quercetin,  $150.7 \pm 23.6$  U/L,  $57.4 \pm 8.4$  U/L,  $0.83 \pm 0.27$   $\mu$ g/L; naloxone,  $148.3 \pm 21.4$  U/L,  $55.2 \pm 7.3$  U/L,  $0.85 \pm 0.34$   $\mu$ g/L vs  $205.0 \pm 31.5$  U/L,  $70.5 \pm 9.2$  U/L,  $4.08 \pm 1.23$   $\mu$ g/L;  $P < 0.05$ ), but were higher in the quercetin and naloxone groups than in the normal contrast group ( $127.6 \pm 17.8$  U/L,  $47.9 \pm 7.1$  U/L,  $0.22 \pm 0.10$   $\mu$ g/L;  $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the degree of liver fatty degeneration in the quercetin and naloxone groups was slight, and the expression level of NF- $\kappa$ B in liver tissue was clearly lower in the quercetin group ( $60.27/\text{HP}$  vs  $28.49/\text{HP}$ ,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Quercetin may have a role in preventing alcoholic fatty liver by inhibiting expression of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$ .

**Key Words:** Alcoholic fatty liver; Quercetin; Tumor necrosis factor-alpha; Nuclear factor kappaB; Rat

Zhang J, Tan SY, Jiang L, Zhu WF, Cheng JH. Effects of quercetin on the expression of nuclear factor-kappaB in alcoholic fatty liver of rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(22): 2399-2402

### 摘要

**目的:** 探讨槲皮素对大鼠酒精性脂肪肝的防治作用及其可能机制。

**方法:** Wistar  $\delta$  鼠48只, 随机分为: 正常对照、酒精性脂肪肝模型、槲皮素处理、纳洛酮处理4组。实验4 wk末, 处死所有大鼠, 检测血AST, ALT和TNF- $\alpha$ , 并行肝脏病理组织学及核转录因子(NF- $\kappa$ B)表达的检测。

**结果:** 槲皮素和纳洛酮组血AST, ALT和TNF- $\alpha$ 明显低于模型组(槲皮素组:  $150.7 \pm 23.6$  U/L,  $57.4 \pm 8.4$  U/L,  $0.83 \pm 0.27$   $\mu$ g/L; 纳洛酮组:  $148.3 \pm 21.4$  U/L,  $55.2 \pm 7.3$  U/L,  $0.85 \pm 0.34$   $\mu$ g/L vs  $205.0 \pm 31.5$  U/L,  $70.5 \pm 9.2$  U/L,  $4.08 \pm 1.23$   $\mu$ g/L;  $P < 0.05$ ), 而高于正常对照组( $127.6 \pm 17.8$  U/L,  $47.9 \pm 7.1$  U/L,  $0.22 \pm 0.10$   $\mu$ g/L;  $P < 0.05$ )。槲皮素和纳洛酮组肝脏脂肪变

### 背景资料

酒精性肝病在我国发病率越来越高, 目前国内外尚无针对酒精性脂肪肝的满意治疗药物。槲皮素具有较强的抗氧化、清除自由基、降血糖、降血脂及降低血压作用。本研究通过其干预实验性酒精性脂肪肝大鼠的体内研究, 探讨其作用机制。

**创新盘点**  
本文采用槲皮素干预实验性酒精性脂肪肝大鼠模型,检测血AST、ALT和TNF- $\alpha$ 的含量,并行肝脏病理组织学及核转录因子(NF- $\kappa$ B)表达的检测,分析了槲皮素的作用机制,为临床应用槲皮素治疗酒精性脂肪肝提供了实验依据。

程度较模型组轻,且槲皮素组肝内NF- $\kappa$ B表达水平显著低于模型组(60.27个/HP vs 28.49个/HP,  $P < 0.05$ )。

**结论:** 槲皮素可能通过抑制NF- $\kappa$ B及TNF- $\alpha$ 的表达,发挥防治酒精性脂肪肝的作用。

**关键词:** 酒精性脂肪肝; 槲皮素; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 核转录因子; 大鼠

张禁, 谭诗云, 蒋琳, 朱卫芳, 程景辉. 槲皮素对大鼠酒精性脂肪肝核转录因子表达水平的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(22):2399-2402  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2399.asp>

## 0 引言

随着生活水平及生活方式的改变,酒精消耗量逐年增加,酒精性肝病在我国发病率也越来越高<sup>[1]</sup>。目前国内外尚无针对酒精性脂肪肝的满意治疗药物<sup>[2-7]</sup>。槲皮素是一种从植物中提取的具有多种生物活性且无明显毒副作用的黄酮类化合物,具有较强的抗氧化、清除自由基、降血糖、降血脂及降低血压作用<sup>[8-11]</sup>。我们通过建立大鼠酒精性脂肪肝模型,以探讨槲皮素对大鼠酒精性脂肪肝的防治作用及其可能作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 槲皮素购自Sigma公司。二锅头白酒(520 mL/L, 150 mL/L)由北京双庆和酒业有限责任公司生产, NF- $\kappa$ B p50兔抗鼠多抗, 购自中山生物公司分装Santa Cruz公司, 生物素标记的兔抗大鼠与兔抗山羊IgG(二抗)购自Sigma公司; SABC复合物与DAB显色试剂盒购自Sigma公司。免疫组织化学LsAB kit购自武汉博士德公司。健康♂ Wistar大鼠48只, 体质量180-220 g, 购自武汉市实验动物中心。

**1.2 方法**<sup>[12]</sup> 大鼠正常喂养1 wk后, 随机抽取12只作为正常对照组, 给予生理盐水15 mL/kg ig, 每日上午1次; 喂以普通饲料; 其余36只大鼠d1-3给予150 mL/L二锅头白酒15 mL/kg ig, 每日上午1次; d4起再随机分为模型组( $n = 12$ )、槲皮素处理组( $n = 12$ )和纳洛酮处理组( $n = 12$ ), 给予520 mL/L二锅头白酒15 mL/kg ig, 每日上午1次, 饲以自制饲料(普通饲料: 猪油为85:15, 每千克饲料加硫酸亚铁5 g)。所有大鼠自始至终均自由饮水。在二锅头白酒ig后1 h, 模型组给予生理盐水5 mL/kg, ip; 槲皮素处理组给予槲皮素0.5 mg/kg, ip; 纳洛酮处理组给予纳洛酮0.08 mg/kg, ip;

正常对照组给予生理盐水5 mL/kg, ip。4 wk末, 所有大鼠禁食禁水一晚, d2上午称体质量, 麻醉, 心尖部采血, 离心, 随后处死动物, 取全肝称质量。计算肝指数: 肝脏湿质量/鼠质量(g/kg)。血清AST, ALT应用日立7060全自动生化分析仪测定, 严格按照试剂盒说明书操作。肝组织块, 40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋, 5  $\mu$ m厚切片, HE染色, 光镜下观察肝脏脂肪变性的程度: 脂肪变肝细胞达30%-50%者为轻度, 50%-75%者为中度, 大于75%者为重度。血清TNF- $\alpha$ 的测定采用双抗体夹心法。用抗TNF mAb T5和T6包板, 以100 mL/L小牛血清封闭, 加入待测血清及倍比稀释的标准TNF- $\alpha$ , 继之加入TNF- $\alpha$ 抗体及辣根过氧化物酶羊抗兔抗体, 底物显色剂, 中止反应后测A值, 根据标准曲线计算TNF- $\alpha$ 的浓度(试剂盒由军事医学科学院生产)。另石蜡切片, 常规抗原修复, 阻断内源性过氧化氢酶, 用抗鼠的NF- $\kappa$ B抗体检测, 最后DAB复合底物显色。

**统计学处理** 检测结果以mean  $\pm$  SD表示, 采用 $t$ 检验, 用SPSS10.0软件进行数据分析。组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$ 为组间差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 肝指数及体质量** 模型组和槲皮素处理组各有1只大鼠因酒精误呛入肺而死亡。纳洛酮处理组有2只大鼠因ig不慎而致胃穿孔死亡。死因均经术后病理解剖证实。体质量变化模型组与槲皮素处理组、纳洛酮处理组之间差别不大( $P > 0.05$ ), 与正常对照组相比差异有显著性( $P < 0.05$ )。模型组与纳洛酮处理组、槲皮素处理组、正常对照组相比, 肝指数逐渐降低, 差异有显著性( $P < 0.05$ ); 槲皮素处理组和纳洛酮处理组之间差别不大( $P > 0.05$ )。

**2.2 肝组织病理学** 正常对照组肝脏颜色红润, 质软。模型组肝脏肿大, 呈明显红白花纹, 整个肝脏颜色黄腻。槲皮素处理组和纳洛酮处理组肝脏大多颜色红润, 但个别可见红白花纹。光镜下观察, 正常对照组肝细胞排列整齐, 肝脏结构完全正常。模型组表现为中度或重度脂肪肝, 病变成弥漫性, 肝细胞索排列紊乱, 肝细胞内脂滴大小不等, 肝细胞核被挤压移位, 肝细胞肿胀呈气球样变, 可见炎性细胞浸润。处理组(槲皮素处理组、纳洛酮处理组)表现为轻度脂肪肝, 有少数炎性细胞浸润。

**2.3 血AST、ALT及TNF- $\alpha$**  模型组与正常对照

表 1 槲皮素、纳洛酮对大鼠肝指数、体质量, 血AST、ALT和TNF- $\alpha$ 变化的影响(mean  $\pm$  SD)

分组	<i>n</i>	肝指数(g/kg)	体质量变化(g)	AST(U/L)	ALT(U/L)	TNF- $\alpha$ ( $\mu$ g/L)
正常对照	12	3.5 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>	37.9 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	127.6 $\pm$ 17.8 <sup>a</sup>	47.9 $\pm$ 7.1 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
模型	11	5.4 $\pm$ 0.4	19.2 $\pm$ 7.3	205.0 $\pm$ 31.5	70.5 $\pm$ 9.2	4.08 $\pm$ 1.23
槲皮素	11	4.2 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>	26.8 $\pm$ 6.0	150.7 $\pm$ 23.6 <sup>a</sup>	57.4 $\pm$ 8.4 <sup>a</sup>	0.83 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
纳洛酮	10	4.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup>	27.0 $\pm$ 5.4	148.3 $\pm$ 21.4 <sup>a</sup>	55.2 $\pm$ 7.3 <sup>a</sup>	0.85 $\pm$ 0.34 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P* < 0.05 vs 模型。

组相比, AST, ALT活性和TNF- $\alpha$ 含量明显升高(*P* < 0.05); 处理组与模型组相比, AST, ALT活性和TNF- $\alpha$ 含量明显下降(*P* < 0.05); 槲皮素处理组和纳洛酮处理组之间差别不大(*P* > 0.05, 表1)。

**2.4 肝组织NF- $\kappa$ B的表达** 部分肝细胞胞质呈阳性染色反应。阳性细胞的数量在模型组(60.27  $\pm$  11.43个/HP)(图1B)较正常对照组(28.49  $\pm$  9.77个/HP)(图1A)明显增高(*P* < 0.05), 且多为沿血管区表达, 与脂肪细胞浸润伴行。与之相比, 槲皮素治疗组(图1C)肝组织NF- $\kappa$ B阳性细胞数目明显减少, 且散在分布, 与血管无明显相关性。

### 3 讨论

近来, 平均每年约有12%的酒精性脂肪肝患者发生肝硬化, 一小部分甚至可发展成肝癌。纳洛酮对酒精性脂肪肝有防治作用<sup>[13-14]</sup>。槲皮素及其衍生物是植物界分布最广、具有多种生物活性的黄酮类化合物, 近年来发现他有许多新作用和多种生物效应如抗肿瘤、抗氧化、抗病毒等。其部分作用机制可能与TNF- $\alpha$ 有关<sup>[15-16]</sup>, 但其对抗脂肪肝的作用目前还不十分清楚, 我们通过酒精性脂肪肝动物模型探讨了槲皮素与TNF和NF- $\kappa$ B之间的某些关系。给予酒精及高脂饮食4 wk后, 模型组AST, ALT明显升高, 且肝脏发生水样变性和脂肪变性的病理改变, 表明酒精中毒性脂肪肝模型成立。我们发现, 槲皮素及纳洛酮组血浆AST, ALT和TNF- $\alpha$ 含量明显低于模型组(*P* < 0.05), 而高于正常对照组(*P* < 0.05)。且TNF与转氨酶之间也存在一定的关系, 转氨酶升高者, TNF的水平也显著升高。在模型组中, 肝组织中可见炎性细胞浸润, 此为TNF产生的基础, 肝脏内生成的TNF可直接作用于肝细胞造成坏死和炎症, 同时TNF- $\alpha$ 引发的中性粒细胞通过释放蛋白酶或氧自由基也可造成肝损害。提示TNF等多种细胞因子在酒精性肝损害模型中起着一定的作用<sup>[17-21]</sup>。在槲皮素、纳洛酮组肝脏脂肪变性程度较模型组轻, 免疫组织化学检查显示, NF- $\kappa$ B

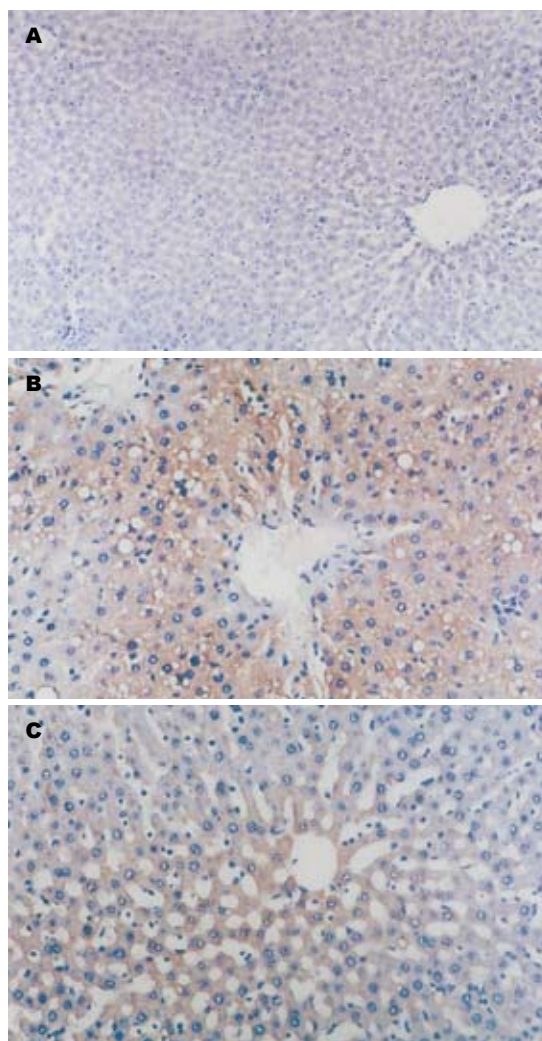


图 1 大鼠肝组织NF- $\kappa$ B表达(SABC  $\times$  400)。A: 正常肝组织; B: 模型组; C: 槲皮素治疗组。

在槲皮素处理组的大鼠肝组织中表达明显少于模型组, 与正常对照组肝脏镜下表现接近; 槲皮素组与模型组相比, 肝指数明显下降。这些也都从侧面说明了槲皮素对酒精性脂肪肝的形成具有一定防治作用。原因为: 槲皮素能清除氧自由基, 减轻或抵消酒精及其代谢物乙醛产生的脂质过氧化损伤, 增加肝脏的能量代谢, 起到保护肝脏的作用。据报道, 槲皮素能抑制许多酶的活

### 应用要点

本研究证实了槲皮素能降低血AST、ALT浓度并可抑制NF- $\kappa$ B及TNF- $\alpha$ 的表达, 发挥防治酒精性脂肪肝的作用, 进一步为临床应用槲皮素治疗酒精性脂肪肝提供了理论依据。

### 名词解释

皮素: 槲皮素化学名为3, 3', 4', 5, 7-五羟基黄酮, 是一种从植物中提取的具有多种生物活性且无明显毒副作用的黄酮类化合物, 具有较强的抗氧化、清除自由基、降血糖、降血脂及降血压作用。

## 同行评价

本文研究了槲皮素对大鼠酒精性脂肪肝的作用。结果提示他可能通过可能通过抑制NF- $\kappa$ B及TNF- $\alpha$ 的表达,发挥防止酒精性脂肪肝的作用。分析有据,论证有理,结构严谨,数据可信,有一定的可读性。

性例如蛋白酶C和酪氨酸激酶,其抗炎作用机制与其抗氧化作用密切相关<sup>[10-11]</sup>。槲皮素是一种非特异性蛋白激酶抑制剂和TNF- $\alpha$ 诱导的NF- $\kappa$ B活化的抑制剂,他可能是通过阻断IKB $\alpha$ 的降解从而阻断接下来的NF- $\kappa$ Bp65亚基的核转位而发挥作用<sup>[22-24]</sup>。

此外,我们在实验中也发现,虽然槲皮素可以改善酒精性脂肪肝的生化指标,但未能将这些生化指标调节到正常水平,可能与槲皮素用量不足或其他因素有关。值得在以后的研究中进一步探索。

## 4 参考文献

- 1 陈晓超,刘树滔,陈躬瑞,饶平凡. 酒精性肝炎的治疗进展. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1130-1136
- 2 Akriviadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119: 1637-1648
- 3 Xu A, Wang Y, Keshaw H, Xu LY, Lam KS, Cooper GJ. The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice. *J Clin Invest* 2003; 112: 91-100
- 4 范建高. 衣食住行与脂肪肝酒精肝防治. 重庆: 重庆出版社, 2002: 198
- 5 Tsutsumi And M, Takase S. Effect of fenofibrate on fatty liver in rats treated with alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 75S-79S
- 6 Lumeng L, Crabb DW. Alcoholic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2001; 17: 211-220
- 7 Nanji AA, Jokelainen K, Tipoe GL, Rahemtulla A, Dannenberg AJ. Dietary saturated fatty acids reverse inflammatory and fibrotic changes in rat liver despite continued ethanol administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 638-644
- 8 Pu F, Mishima K, Irie K, Motohashi K, Tanaka Y, Orito K, Egawa T, Kitamura Y, Egashira N, Iwasaki K, Fujiwara M. Neuroprotective Effects of Quercetin and Rutin on Spatial Memory Impairment in an 8-Arm Radial Maze Task and Neuronal Death Induced by Repeated Cerebral Ischemia in Rats. *J Pharmacol Sci* 2007
- 9 Sun H, Cheng XP, You-Ye Z, Jiang P, Zhou JN. Quercetin subunit specifically reduces GlyR-mediated current in rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 2007
- 10 Yao P, Nussler A, Liu L, Hao L, Song F, Schirmeier A, Nussler N. Quercetin protects human hepatocytes from ethanol-derived oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via the MAPK/Nrf2 pathways. *J Hepatol* 2007; 47: 253-261
- 11 Amalia PM, Possa MN, Augusto MC, Francisca LS. Quercetin Prevents Oxidative Stress in Cirrhotic Rats. *Dig Dis Sci* 2007
- 12 冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 罗和生, 漆楚波, 郭洁, 李海霞. 大鼠急性酒精性脂肪肝造模方法的改进. 世界华人消化杂志 2003; 11: 1189-1192
- 13 曹绍歧, 谭诗云, 冯志强, 沈志祥. 纳洛酮对鼠酒精性脂肪肝血浆 $\beta$ -内啡肽水平的影响. 中国药理学通报 2004; 20: 1276-1279
- 14 冯志强, 沈志祥, 谭诗云, 漆楚波, 郭洁, 李海霞. 纳洛酮和必需磷脂防治酒精性脂肪肝的实验研究. 中华消化杂志 2003; 23: 752-753
- 15 Schumann J, Wolf D, Pahl A, Brune K, Papadopoulos T, van Rooijen N, Tiegs G. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. *Am J Pathol* 2000; 157: 1671-1683
- 16 Ruiz PA, Braune A, Holzwimmer G, Quintanilla-Fend L, Haller D. Quercetin inhibits TNF-induced NF-kappaB transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. *J Nutr* 2007; 137: 1208-1215
- 17 冯志强, 沈志祥, 谭诗云. 酒精性脂肪肝的发病机制研究进展. 世界华人消化杂志 2002; 10: 346-348
- 18 Song Z, Zhou Z, Uriarte S, Wang L, Kang YJ, Chen T, Barve S, McClain CJ. S-adenosylhomocysteine sensitizes to TNF-alpha hepatotoxicity in mice and liver cells: a possible etiological factor in alcoholic liver disease. *Hepatology* 2004; 40: 989-997
- 19 Prandota J. Important role of prodromal viral infections responsible for inhibition of xenobiotic metabolizing enzymes in the pathomechanism of idiopathic Reye's syndrome, Stevens-Johnson syndrome, autoimmune hepatitis, and hepatotoxicity of the therapeutic doses of acetaminophen used in genetically predisposed persons. *Am J Ther* 2002; 9: 149-156
- 20 Lieber CS. CYP2E1: from ASH to NASH. *Hepatol Res* 2004; 28: 1-11
- 21 Oz HS, Im HJ, Chen TS, de Villiers WJ, McClain CJ. Glutathione-enhancing agents protect against steatohepatitis in a dietary model. *J Biochem Mol Toxicol* 2006; 20: 39-47
- 22 Min YD, Choi CH, Bark H, Son HY, Park HH, Lee S, Park JW, Park EK, Shin HI, Kim SH. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflamm Res* 2007; 56: 210-215
- 23 Hutter D, Greene JJ. Influence of the cellular redox state on NF-kappaB-regulated gene expression. *J Cell Physiol* 2000; 183: 45-52
- 24 Nathens AB, Bitar R, Watson RW, Issekutz TB, Marshall JC, Dackiw AP, Rotstein OD. Thiol-mediated regulation of ICAM-1 expression in endotoxin-induced acute lung injury. *J Immunol* 1998; 160: 2959-2966

编辑 程剑侠 电编 郭海丽