

槲皮素-白蛋白纳米粒的制备及其对NASH肝纤维化的体内外抑制作用^Δ

陈紫莹^{1*}, 张薇¹, 覃萍¹, 陈永苗², 张传平³, 李俊伟³, 陈阿丽^{1#}(1. 广东药科大学医药化工学院, 广州 510006; 2. 广东药科大学附属第一医院药学部, 广州 501080; 3. 广州白云山和记黄埔中药有限公司, 广州 510515)

中图分类号 R943;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)08-0930-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.08.05



摘要 目的 制备槲皮素-白蛋白纳米粒(Que-HSA-NPs),并评价Que-HSA-NPs对非酒精性脂肪性肝炎(NASH)肝纤维化的体内外抑制作用。方法 运用去溶剂化-化学交联法制备Que-HSA-NPs,观察其外观特征并检测其粒径、多分散指数(PDI)、Zeta电位和载药量。将槲皮素(Que)和Que-HSA-NPs作用于鼠源HSC-T6细胞,比较两者对细胞存活率及对转化生长因子 β (TGF- β)、I型胶原 α 1(COL1A1)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)mRNA表达的影响。将Que和Que-HSA-NPs作用于经低蛋氨酸和胆碱缺乏高脂鼠粮喂养的小鼠,通过测定其血清肝损伤指标水平,肝组织病理学特征,肝组织中TGF- β 、COL1A1、 α -SMA mRNA表达以及肝组织中 α -SMA蛋白表达的变化来评价两者对小鼠NASH肝纤维化的改善作用。结果 所制Que-HSA-NPs呈球形,粒径为(172.9 \pm 2.2) nm, PDI为0.233, Zeta电位为-29.2 mV, 载药量为2.99%。0~250 μ g/mL的Que和Que-HSA-NPs对HSC-T6细胞无毒,两者均能显著降低细胞中TGF- β 、COL1A1和 α -SMA mRNA的表达,且Que-HSA-NPs的作用更强($P<0.05$)。两者均能显著降低模型小鼠血清中肝损伤指标水平,减轻肝损伤,下调肝组织中TGF- β 、COL1A1、 α -SMA mRNA和 α -SMA蛋白的表达,且Que-HSA-NPs的作用更具优势($P<0.05$)。结论 本研究成功制备了Que-HSA-NPs,并证实其抗NASH肝纤维化的药效优于Que。

关键词 槲皮素;槲皮素-白蛋白纳米粒;非酒精性脂肪性肝炎;肝纤维化;体内外研究

Preparation of quercetin-human serum albumin-nanoparticles and its inhibitory effects against NASH-induced liver fibrosis *in vivo* and *in vitro*

CHEN Ziying¹, ZHANG Wei¹, QIN Ping¹, CHEN Yongmiao², ZHANG Chuanping³, LI Junwei³, CHEN Ali¹
(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 501080, China; 3. Hutchison Whampoa Guangzhou Baiyunshan Chinese Medicine Company Limited, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To prepare quercetin-human serum albumin-nanoparticles (Que-HSA-NPs), and to evaluate the *in vivo* and *in vitro* inhibitory effects of Que-HSA-NPs on hepatic fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). **METHODS** Que-HSA-NPs were prepared by desolvation-chemical cross-linking method, their appearance characteristics were observed, and their particle size, polydispersity index (PDI), Zeta potential and drug loading were detected. Quercetin (Que) and Que-HSA-NPs were applied to murine HSC-T6 cells. The effects of them on survival rate of HSC-T6, mRNA expression of transforming growth factor β (TGF- β), Type I collagen α 1 (COL1A1) and α -smooth muscle actin (α -SMA) were compared. Que and Que-HSA-NPs were applied to mice fed with low methionine and choline deficient high-fat diet. The serum levels of liver injury indexes, liver pathological characteristics, mRNA expressions of TGF- β , COL1A1 and α -SMA, protein expression of α -SMA in liver tissue were determined to evaluate the improvement effects of them on hepatic fibrosis of NASH in mice. **RESULTS** The prepared Que-HSA-NPs was spherical, the particle size was (172.9 \pm 2.2)nm, the PDI was 0.233, the Zeta potential was -29.2 mV, and the drug loading was 2.99%. Que and Que-HSA-NPs were nontoxic to HSC-T6 at concentrations of 0-250 μ g/mL. Both of them could significantly decrease mRNA expressions of TGF- β , COL1A1 and α -SMA, especially Que-HSA-NPs ($P<0.05$). They also could significantly decrease the serum levels of liver injury index, relieve liver injury and down-regulate mRNA expressions of TGF- β , COL1A1 and α -SMA and protein expression of α -SMA, especially Que-HSA-NPs ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Que-HSA-NPs is successfully prepared, and confirm that its anti-NASH hepatic fibrosis effect is better than that of Que.

* 硕士研究生。研究方向:药品检验与分析。E-mail:577368765@qq.com

通信作者:高级实验师,硕士生导师。研究方向:中药药效物质基础及新药开发。电话:020-39352553。E-mail:chenali2004@163.com

KEYWORDS quercetin; quercetin-human serum albumin-nanoparticles; non-alcoholic steatohepatitis; hepatic fibrosis; inhibitory effect *in vivo* and *in vitro* study

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)是一系列与肥胖、2型糖尿病及代谢综合征密切相关的肝脏疾病,被定义为在几乎没有酒精摄入、病毒感染或其他特定因素的状态下,超过5%的肝细胞存在脂肪变性的疾病^[1]。NAFLD已成为全球范围内常见的慢性肝脏疾病之一,其在全球范围内的患病率约为25%^[2]。NAFLD疾病谱包括非酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、非酒精性脂肪性肝纤维化和肝硬化。其中,NASH是一种潜在的进行性肝脏疾病,可导致肝硬化、肝细胞癌和死亡^[3],NASH及其相关肝纤维化是诱发NAFLD患者死亡的主要原因^[4]。肝纤维化是肝细胞外基质异常沉积的病理过程,逆转肝纤维化可有助于防止患者病情向肝硬化、肝癌恶化^[4]。但迄今为止,尚无有效治疗NASH肝纤维化的临床药物。

槲皮素(quercetin, Que)具备清除自由基、保护肝损伤、抗肝纤维化等药理作用,是治疗肝脏疾病的有效活性成分之一^[5]。作为黄酮类化合物的一种,Que的水溶性差(约1 mg/L),口服吸收不佳,化学稳定性差,极大地影响了药物的生物利用度^[6]。由肝脏产生的人血清白蛋白(human serum albumin, HSA)作为药物载体时,具备生物相容性良好、安全、无毒、可降解、靶向性佳等优势^[7]。基于此,本研究拟制备槲皮素-白蛋白纳米粒(quercetin-HSA-nanoparticles, Que-HSA-NPs),并评价Que-HSA-NPs对NASH肝纤维化的作用,为Que-HSA-NPs的深入研究和应用提供理论依据,也为抗NASH肝纤维化纳米制剂的研发提供方向。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括ZETASIZER NANO ZS型激光粒度仪(英国Malvern公司),UV1300/1500型紫外-可见分光光度计[美析(中国)仪器有限公司],H-7650型透射电镜[日立高新技术(上海)国际贸易有限公司],CLM-170B-8-NF型二氧化碳(CO₂)细胞培养箱(新加坡Esco公司),BHC-1000 II A/B3型超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司),DMI8型倒置显微镜、BX51型显微镜(德国Leica公司),5810R型离心机(德国Eppendorf公司),ND ONE型微量分光光度计和荧光分光光度计、5100型实时聚合酶链反应(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR)仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),EON型多功能酶标仪(美国BioTek公司),ZT-12M型脱水机、YB-6LF型石蜡包埋机、3126F型石蜡切片机、YT7FB型烘片机(亚光医用电子科技有限公司),JXFSTPRP-24型匀浆机(上海净信实业发展有限公司),MINICHEMI型凝胶自动成像仪(北京赛智创业科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

Que原料药(纯度≥95%)、HSA、伊红、苏木精(批号

分别为Q4951、A0307A、SLBV2994、SLBV6928)均购自美国Sigma公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,批号Y190601)购自广州瑞舒生物科技有限公司;1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC,批号C10081863]购自上海麦克林生化科技有限公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、DMEM高糖培养基、胎牛血清(批号分别为8121318、8121334、2275124)均购自美国Gibco公司;青霉素-链霉素双抗(批号30002351)购自美国Corning公司;胰酶细胞消化液(批号21105381)购自北京Biosharp公司;CCK-8试剂盒购于日本Dojindo公司;TRIZOL试剂(批号290307)购自美国Invitrogen公司;无酶水(批号GB19KA7899)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Evo M-MLV反转录预混型试剂盒(批号A3A1201)购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)活性试剂盒和Masson试剂盒(批号分别为20210305、20210120、20210317)均购自南京建成生物工程研究所有限公司;蛋白酶抑制剂(批号45582400)购自瑞士Roche公司;RIPA裂解液(批号12G235174)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;兔源 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体(批号ab5694)购自英国Abcam公司;兔源热休克蛋白90(heat shock protein 90, HSP90)单克隆抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(immunoglobulin G, IgG)二抗(批号分别为4877、7074s)均购自美国CST公司;增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂(批号170-5061)购自美国Bio-Rad公司;转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)、I型胶原 α 1(collagen type I α 1, COL1A1)的引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成(见表1);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为蒸馏水。

表1 PCR引物序列

基因	上游(5'→3')	下游(5'→3')
TGF- β	CTCCCGTGGCTTCTAGTGC	GCCTTAGTTTGGACAGGATCT
COL1A1	GCTCCTCTTAGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG
α -SMA	GTCCAGACATCAGGGAGTAA	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
β -actin	CGTGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTACACGCAGAT

1.3 细胞、动物及饲料

本研究所用的鼠源HSC-T6细胞由广东药科大学叶得伟教授课题组赠予;8周龄SPF级C57BL/6J雄性小鼠[生产许可证号SCXK(豫)2020-0005]由河南斯克贝斯生物科技股份有限公司提供并饲养于广东药科大学实验动物中心;低蛋氨酸和胆碱缺乏高脂鼠粮(批号为CDAHf60)购于戴茨生物科技(无锡)有限公司。本动物实验方案经广东药科大学实验动物伦理委员会审查

批准后实施(受理编号gdpulac2020143)。

2 方法

2.1 Que-HSA-NPs的制备

采用去溶剂化-化学交联法制备。将Que原料药溶解在DMSO中,得质量浓度为20 mg/mL的Que溶液;将HSA溶解在PBS中,涡旋使充分溶解,得质量浓度为5 mg/mL的HSA溶液。取HSA溶液2 mL于烧杯中,将烧杯置于磁力搅拌器上,取Que溶液50 μ L以1 mL/min的滴速滴入HSA溶液中,得黄色胶状混合物;通过自动注射泵以1 mL/min的速度将乙醇[用以去溶剂化,即通过脱水剂(乙醇)除去HSA的水化膜,使HSA的疏水区域暴露]2 mL滴入上述黄色胶状混合物中,然后在室温下避光搅拌3 h;搅拌充分后,加入EDC进行化学交联,反应12 h后将黄色胶状混合物以10 000 r/min离心15 min \times 3次以除去未结合的Que和DMSO;将离心纯化所得沉淀物重新分散到PBS中,即得Que-HSA-NPs混悬液,于4 $^{\circ}$ C下储存,备用。

2.2 Que-HSA-NPs的表征

取上述Que-HSA-NPs混悬液,使用激光粒度仪测定粒径大小和分布、Zeta电位,使用透射电镜观察形态特征(3%磷钨酸染色,pH7.0),使用紫外-可见分光光度计测定载药量^[8]。

2.3 体外实验

2.3.1 细胞活性的检测 采用CCK-8法进行检测。将HSC-T6细胞以 1×10^5 个/mL接种于96孔板,每孔100 μ L。待细胞贴壁并增殖到70%左右时,分别加入含0(对照组)、1、5、25、125、250、500 μ g/mL(浓度参考预实验结果设置)Que原料药或Que-HSA-NPs(以Que计)的完全培养基(即含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的DMEM高糖培养基,下同),于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂下培养(培养条件下同),同时设置不含细胞和药物的空白孔。12 h后,吸弃培养基,加入含10% CCK-8试剂的完全培养基,孵育2 h后,使用酶标仪在450 nm波长下测定各孔的光密度(optical density, OD),并根据下式计算细胞存活率:细胞存活率=[(OD_{实验孔} - OD_{空白孔})/(OD_{对照孔} - OD_{空白孔})] \times 100%。每个浓度设置6个复孔,实验重复3次。

2.3.2 细胞中TGF- β 、COL1A1和 α -SMA mRNA表达情况的检测 采用real-time PCR法进行检测。将HSC-T6细胞以 1×10^5 个/mL接种于6孔板,每孔2 mL。将细胞分为对照组、Que给药组和Que-HSA-NPs给药组,每组设置3个复孔。培养24 h后,分别加入含0(对照组)、50、100、200 μ g/mL(浓度参考上述CCK-8实验结果设置)Que原料药或Que-HSA-NPs(以Que计)的完全培养基,继续培养。24 h后,收集细胞,加入TRIZOL试剂和氯仿、异丙醇等试剂提取细胞的总RNA并用无酶水复溶;取上述复溶溶液1 μ L于微量分光光度计和荧光分光光度计上测定RNA含量并验证其纯度后,按试剂盒说明书操作将RNA反转录成cDNA,并以cDNA为模板进

行PCR扩增。PCR反应体系(共10 μ L)包括:cDNA模板0.5 μ L, TB Greenpremix Ex Taq II 5 μ L,上、下游引物各0.4 μ L, DEPC水3.7 μ L。PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性30 s;95 $^{\circ}$ C变性5 s,55 $^{\circ}$ C退火20 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,40个循环。采用2^{- $\Delta\Delta$ CT}法计算各目标mRNA的相对表达量。

2.4 体内实验

2.4.1 造模与给药 将32只C57BL/6J小鼠分为空白对照组、模型组、Que给药组、Que-HSA-NPs给药组,每组8只。除空白对照组外,模型组、Que给药组和Que-HSA-NPs给药组给予低蛋氨酸和胆碱缺乏高脂鼠粮12周以复制NASH肝纤维化模型。喂养6周后,空白对照组、模型组小鼠尾静脉注射PBS,Que给药组和Que-HSA-NPs给药组小鼠尾静脉注射Que原料药或Que-HSA-NPs(以PBS为溶剂,注射前振荡混匀)25 mg/kg^[9],每周3次,共6周。

2.4.2 标本采集与处理 给药结束后,腹腔注射3%戊巴比妥溶液麻醉,剖开腹腔,于腹主动脉采血(无需置于抗凝管中),血样静置2 h后以4 500 r/min离心12 min,收集上层血清并于-80 $^{\circ}$ C下保存。取肝组织适量,置于4%中性福尔马林溶液中固定24 h以进行组织病理学检测,其余肝组织于-80 $^{\circ}$ C下保存,备用。

2.4.3 肝损伤指标检测 将血清样本解冻,振荡混匀;严格按照ALT、AST试剂盒说明书步骤,使用酶标仪检测各组小鼠血清中ALT、AST的水平。

2.4.4 小鼠肝组织病理学观察 组织切片分别经苏木精-伊红(hematoxylin and eosin staining, HE)和Masson染色后,于显微镜下观察各组小鼠肝组织的染色情况。在高倍视野下随机选取小鼠肝组织Masson染色图5张,使用Image J 8.0软件测量每个视野下的纤维化程度。

2.4.5 小鼠肝组织中TGF- β 、COL1A1和 α -SMA mRNA表达情况检测 采用real-time PCR法进行检测。取小鼠肝组织约10 mg,置于1.5 mL EP管中,加入TRIZOL试剂和氯仿、异丙醇等试剂提取细胞的总RNA,后续按“2.3.2”项下方法操作,测定各组小鼠肝组织中TGF- β 、COL1A1和 α -SMA mRNA的相对表达量。

2.4.6 小鼠肝组织中 α -SMA蛋白表达量的检测 采用Western blot法进行检测。取小鼠肝组织约10 mg,加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取肝组织的总蛋白,测定浓度后将蛋白变性。变性蛋白经8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶电压80 V,分离胶电压120 V,电泳时间约2 h)分离后,以湿转法(恒定电流200 mA,约120 min)转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉封闭1.5 h,加入目标蛋白 α -SMA、内参HSP90一抗(稀释比例分别为1:200、1:1 000),于4 $^{\circ}$ C孵育过夜;用TBST缓冲液清洗3次后,加入HRP标记的IgG二抗(稀释比例为1:2 000)孵育1 h,加入ECL试剂显影并于凝胶自动成像仪上成像。使用Image J 8.0软件分析各条带灰度值,以目标蛋白与内参蛋白灰度值的比值作为其表达量。

2.5 统计学方法

使用SPSS 25.0软件进行统计学分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 Que-HSA-NPs的表征

Que-HSA-NPs的粒径为 (172.9 ± 2.2) nm(图1A),多分散指数(polydispersity index, PDI)为0.233; Zeta电位为 -29.2 mV(图1B),绝对值较高,稳定性较好(图1C)。所得纳米颗粒呈球形,粒径大小在200 nm左右(图1D),载药量为2.99%。

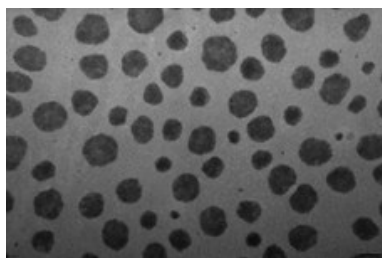
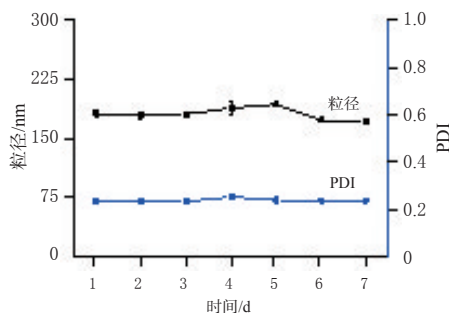
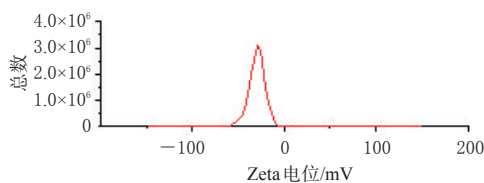
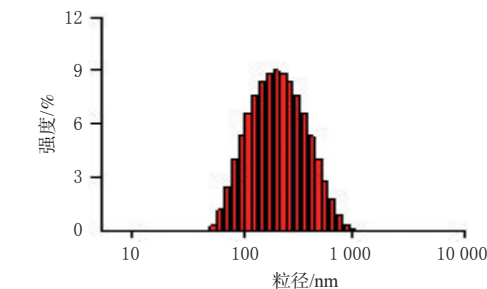


图1 Que-HSA-NPs的表征

3.2 Que-HSA-NPs和Que对细胞存活率的影响

在含0~250 $\mu\text{g/mL}$ 的Que-HSA-NPs或Que的培养基中,细胞的存活率均大于90%;当Que-HSA-NPs或Que的质量浓度 >250 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞的存活率均小于70%。结果见图2。

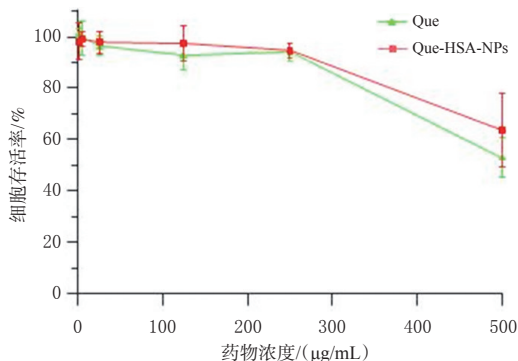
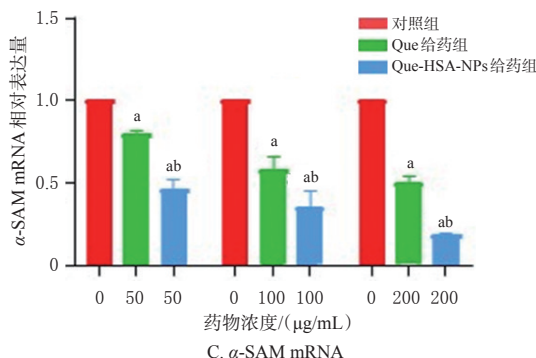
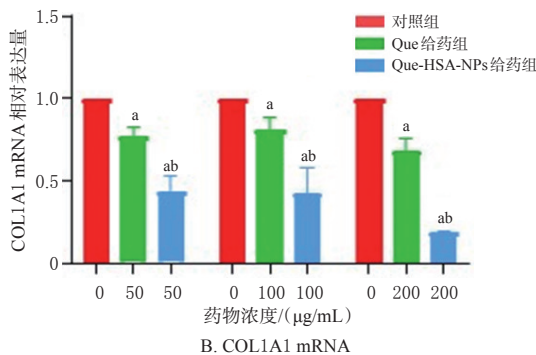
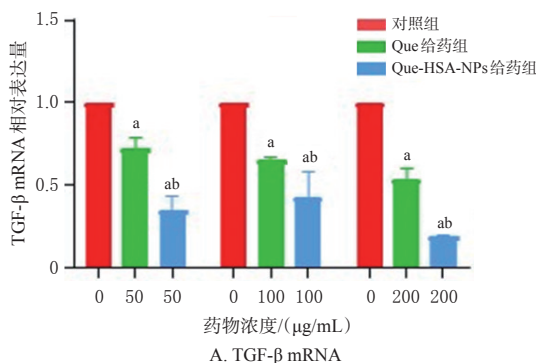


图2 各组HSC-T6细胞的存活率

3.3 Que-HSA-NPs和Que对细胞中TGF- β 、COL1A1和 α -SMA mRNA表达的影响

与对照组比较,Que-HSA-NPs给药组和Que给药组细胞中TGF- β 、COL1A1、 α -SMA mRNA的相对表达量均显著降低,且Que-HSA-NPs给药组上述指标均显著低于Que给药组($P < 0.05$)。结果见图3。

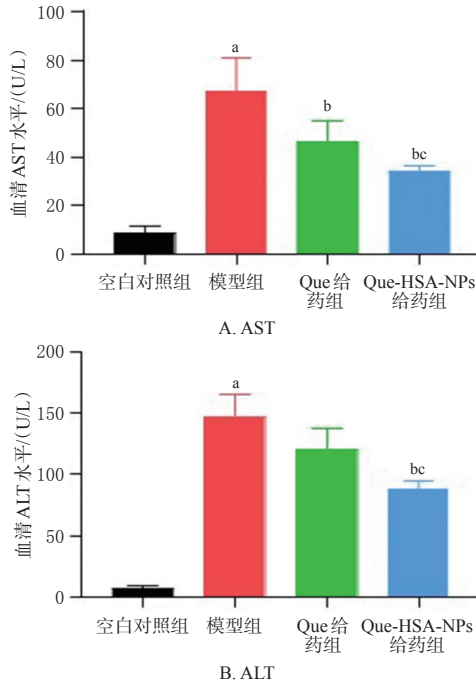


a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与Que给药组比较, $P < 0.05$

图3 各组HSC-T6细胞中TGF- β 、COL1A1、 α -SMA mRNA的相对表达量

3.4 Que-HSA-NPs 和 Que 对小鼠血清中 AST、ALT 水平的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠血清AST、ALT水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,Que-HSA-NPs 给药组小鼠血清AST、ALT水平和Que给药组小鼠血清AST水平均显著降低,且Que-HSA-NPs 给药组小鼠血清AST、ALT均显著低于Que给药组($P < 0.05$)。结果见图4。



a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与Que给药组比较, $P < 0.05$

图4 各组小鼠血清中肝损伤指标的水平

3.5 小鼠肝组织病理学检查

3.5.1 HE 染色 空白对照组小鼠肝细胞正常,排列整齐,汇管区结构清晰完整;模型组小鼠肝细胞排列紊乱,可见大面积的脂肪变性和炎症细胞浸润;Que给药组和Que-HSA-NPs 给药组小鼠肝组织的脂肪变性均较模型组有所缓解,且Que-HSA-NPs 给药组小鼠肝组织中脂肪空泡的面积更小、数量更少。结果见图5。

3.5.2 Masson 染色 空白对照组小鼠肝组织内未见纤维组织增生情况;与空白对照组比较,模型组小鼠肝组织可见大面积的蓝紫色胶原沉积区域($P < 0.05$)。经药物干预后,Que-HSA-NPs 给药组小鼠肝组织中的胶原沉积区域较模型组、Que给药组显著缩小($P < 0.05$);Que给药组小鼠肝组织中的胶原沉积区域虽有缩小,但与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图6、图7。

3.6 Que-HSA-NPs 和 Que 对小鼠肝组织中 TGF- β 、COL1A1 和 α -SMA mRNA 表达的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠肝组织中TGF- β 、COL1A1、 α -SMA mRNA的相对表达量均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,Que-HSA-NPs 给药组和Que给药组小鼠肝组织中TGF- β 、COL1A1、 α -SMA mRNA的相

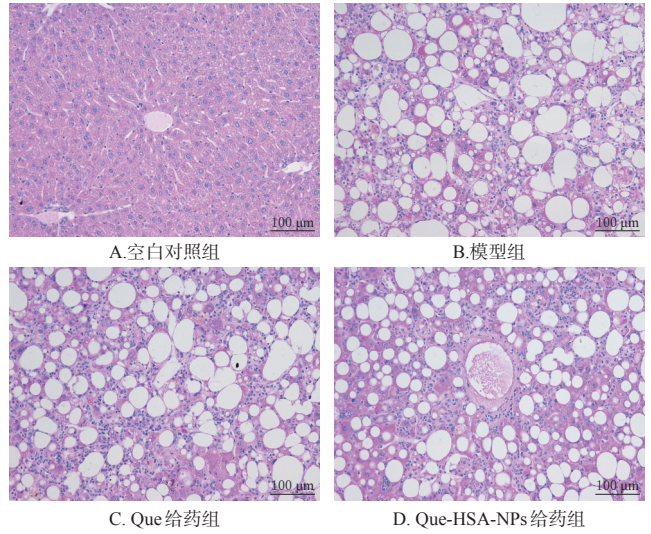


图5 各组小鼠肝组织的显微图(HE染色, $\times 200$)

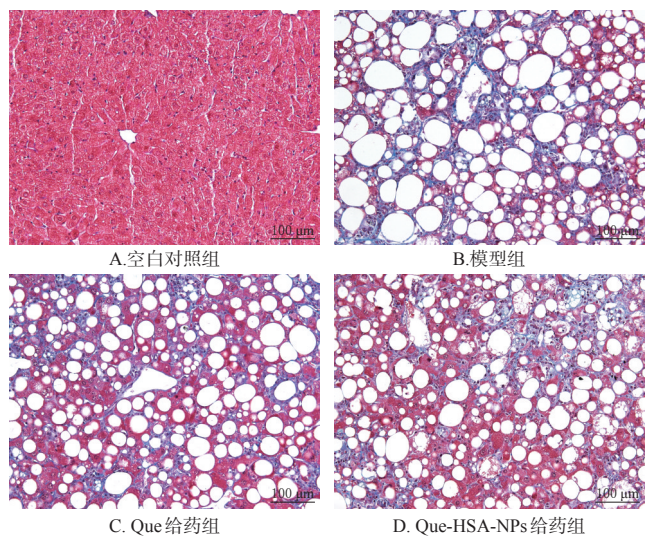
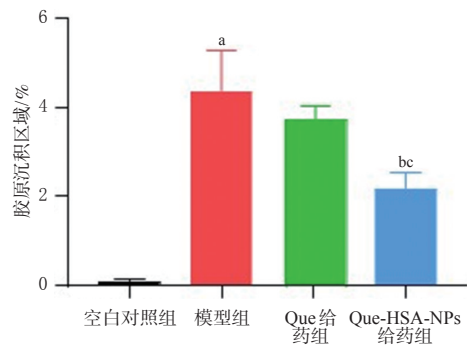


图6 各组小鼠肝组织的显微图(Masson染色, $\times 200$)



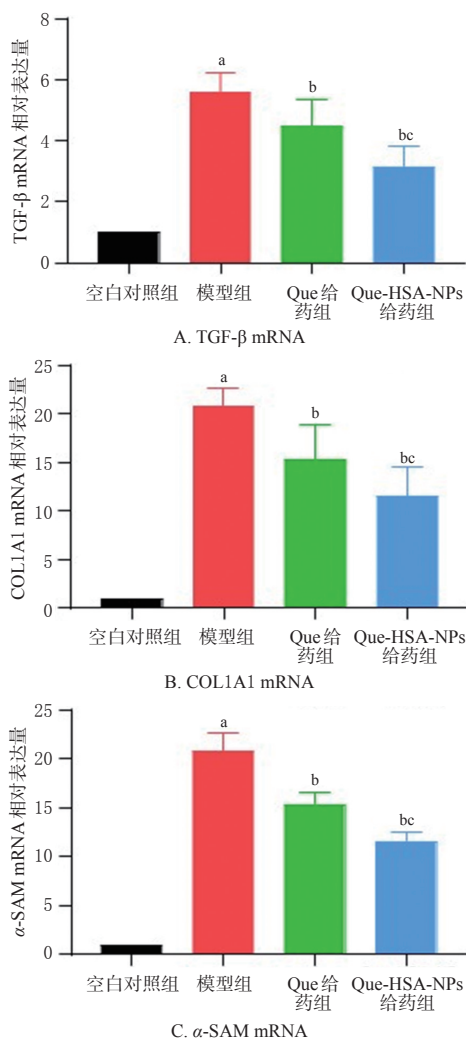
a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与Que给药组比较, $P < 0.05$

图7 各组小鼠肝组织半定量分析图(Masson染色)

对表达量均显著降低($P < 0.05$),且Que-HSA-NPs 给药组小鼠的上述指标均显著低于Que给药组($P < 0.05$)。结果见图8。

3.7 Que-HSA-NPs 和 Que 对小鼠肝组织中 α -SMA 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,模型组小鼠肝组织中 α -SMA蛋



a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与 Que 给药组比较, $P < 0.05$

图8 各组小鼠肝组织中 TGF-β、COL1A1 和 α-SAM mRNA 的相对表达量

白的表达量显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, Que-HSA-NPs 给药组和 Que 给药组小鼠肝组织中 α-SMA 蛋白的表达量均显著降低, 且 Que-HSA-NPs 给药组显著低于 Que 给药组 ($P < 0.05$)。结果见图9、图10。

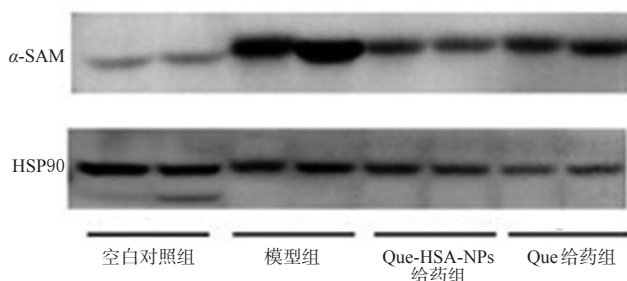
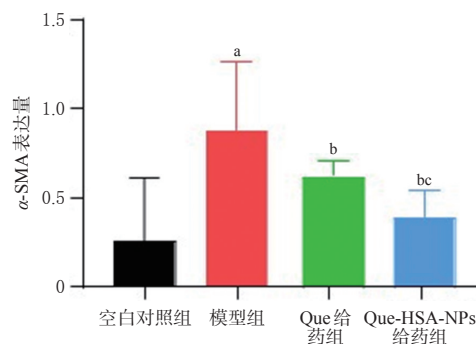


图9 各组小鼠肝组织中 α-SMA 蛋白表达的电泳图

4 讨论

Que 在肝脏疾病不同阶段有着不同作用途径, 可通过调控核因子κB/Toll 样受体/NOD 样受体家族3 炎症小体 (nuclear factor-κB/Toll-like receptor/NOD-like receptor



a: 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b: 与模型组比较, $P < 0.05$; c: 与 Que 给药组比较, $P < 0.05$

图10 各组小鼠肝组织中 α-SMA 蛋白的表达量

protein 3 inflammasome, NF-κB/TLR/NLRP3) 信号通路来抑制肝脏炎症^[10], 可减少磷脂酰肌醇3-激酶/核转录因子红系2 相关因子2 (phosphoinositide 3-kinase/nuclear factor erythroid 2-related factor 2, PI3K/Nrf2) 介导的氧化应激, 可减少自噬中雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的激活, 并可抑制与肝脏疾病发展相关的凋亡因子的表达^[11]。在肝纤维化阶段, Que 可抑制基质细胞外基质沉积, 影响内质网应激和细胞凋亡^[12]。在肝癌阶段, Que 可通过调控人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT)、丝裂原活化蛋白激酶激酶1/(细胞外调节蛋白激酶1/2) [mitogen-activated protein kinase 1/(extracellular signal-regulated protein kinases 1/2), MEK1/(ERK1/2)] 和 Notch 等相关信号通路来抑制癌细胞增殖和扩散^[13-15]。可见, Que 是一种有效的肝脏保护剂。但 Que 的水溶性差 (约 1 mg/L), 口服吸收不佳, 化学稳定性差, 极大地影响了药物的生物利用度。

美国食品药品监督管理局 (U.S. Food and Drug Administration, FDA) 已批准了紫杉醇白蛋白纳米粒制剂用于治疗某些癌症^[16]。有研究指出, HSA 作为药物载体, 具备安全、无毒、生物相容性好、稳定性好、载药性能好、体内半衰期较长等优点, 上述特点为增强 Que 肝保护活性提供了可能。

晚期肝纤维化会导致肝硬化, 肝硬化是进行性肝纤维化的终末阶段。据估计, 肝硬化影响全球 1%~2% 的人口, 每年导致超过 100 万人死亡^[17]。早期肝纤维化是一个可逆的过程, 减弱或消除导致纤维化形成的因素会使实验性和临床肝纤维化消退^[18]。但迄今为止, 临床尚无有效治疗 NASH 肝纤维化的药物, 其研发成为 NAFLD 治疗的瓶颈, 亟待解决^[19]。

AST 和 ALT 是一组能够反映肝损伤的重要参数^[20]。经 HE 染色后, 正常组织/细胞和 NASH 纤维化病变组织/细胞可被明显区分; Masson 染色法是一种用 2 种或 3 种阴离子染料染色以呈现组织中纤维种类、数量的方法, 其最终染色结果是使肌纤维呈红色, 胶原纤维呈蓝色^[21]。α-SMA 为肝星状细胞 (hepatic stellate cell,

HSC)激活的标志^[22];TGF- β 是促纤维化的主要细胞因子之一^[23],I型胶原蛋白是细胞外基质的主要成分^[24],故定量分析 α -SMA、TGF- β 、COL1A1 mRNA的表达可用于评价肝纤维化的严重程度。

有研究指出,低蛋氨酸和胆碱缺乏高脂鼠粮喂养8周即可诱导实验动物NASH肝纤维化^[25]。本研究利用低蛋氨酸和胆碱缺乏高脂鼠粮诱导以复制小鼠NASH肝纤维化模型,并给予Que原料药和Que-HAS-NPs干预,结果显示,与Que原料药相比,Que-HSA-NPs能更显著地减轻小鼠的肝损伤情况,改善其胶原沉积,抑制促纤维化因子的表达并下调 α -SMA的表达。上述结果表明Que-HSA-NPs抗NASH肝纤维化作用更明显。

HSC-T6为激活的HSC,可直接用于实验^[26]。本研究将Que原料药和Que-HAS-NPs应用于HSC-T6以观察经HAS包载的Que是否能更好地抑制促肝纤维化因子的表达。结果显示,Que原料药和Que-HAS-NPs均能下调肝纤维化因子的表达,且Que-HSA-NPs的效果更显著,提示Que-HSA-NPs的抗肝纤维化效果更佳。

参考文献

[1] YOUNOSSI Z, ANSTEE Q M, MARIETTI M, et al. Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018, 15(1): 11-20.

[2] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepatology, 2014, 60(6): 2099-2108.

[3] YOUNOSSI Z M. Non-alcoholic fatty liver disease: a global public health perspective[J]. J Hepatol, 2019, 70(3): 531-544.

[4] SCHWABE R F, TABAS I, PAJVANI U B. Mechanisms of fibrosis development in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Gastroenterology, 2020, 158(7): 1913-1928.

[5] ZHAO X T, WANG J, DENG Y, et al. Quercetin as a protective agent for liver diseases: a comprehensive descriptive review of the molecular mechanism[J]. Phytother Res, 2021, 35(9): 4727-4747.

[6] 陈丽娜,任晓亮,刘亚男,等. 槲皮素平衡溶解度的测定及热力学计算[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 1006-1009.

[7] ZHOU Y X, QUAN G L, WU Q L, et al. Mesoporous silica nanoparticles for drug and gene delivery[J]. Acta Pharm Sin B, 2018, 8(2): 165-177.

[8] 王凯艳. 白头翁皂苷D白蛋白纳米粒制备及药动学初步研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2020.

[9] 张洋. 纳米脂质体槲皮素对肝损伤大鼠保肝作用的研究[D]. 长沙: 中南大学, 2012.

[10] LI T, LI F, LIU X Y, et al. Synergistic anti-inflammatory effects of quercetin and catechin via inhibiting activation of TLR4-MyD88-mediated NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. Phytother Res, 2019, 33(3): 756-767.

[11] ZHAO X T, GONG L H, WANG C, et al. Quercetin miti-

gates ethanol-induced hepatic steatosis in zebrafish via P2X7R-mediated PI3K/Keap1/Nrf2 signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 268: 113569.

[12] ZHAO X, WANG J, DENG Y, et al. Quercetin as a protective agent for liver diseases: a comprehensive descriptive review of the molecular mechanism[J]. Phytother Res, 2021, 35(9): 4727-4747.

[13] FERNÁNDEZ-PALANCA P, FONDEVILA F, MÉNDEZBLANCO C, et al. Antitumor effects of quercetin in hepatocarcinoma *in vitro* and *in vivo* models: a systematic review[J]. Nutrients, 2019, 11(12): 2875.

[14] SALAMA Y A, EL-KAREF A, EL GAYYAR A M, et al. Beyond its antioxidant properties: quercetin targets multiple signalling pathways in hepatocellular carcinoma in rats[J]. Life Sci, 2019, 236: 116933.

[15] NOVO M C, OSUGUI L, DOS REIS V O, et al. Blockage of Wnt/ β -catenin signaling by quercetin reduces survival and proliferation of B-1 cells *in vitro*[J]. Immunobiology, 2015, 220(1): 60-67.

[16] KRATZ F. A clinical update of using albumin as a drug vehicle: a commentary[J]. J Control Release, 2014, 190: 331-336.

[17] SEOW T K, LIANG R C, LEOW C K, et al. Hepatocellular carcinoma: from bedside to proteomics[J]. Proteomics, 2001, 1(10): 1249-1263.

[18] SMITH A, BAUMGARTNER K, BOSITIS C. Cirrhosis: diagnosis and management[J]. Am Fam Physician, 2019, 100(12): 759-770.

[19] SCHUPPAN D, SURABATTULA R, WANG X Y. Determinants of fibrosis progression and regression in NASH[J]. J Hepatol, 2018, 68(2): 238-250.

[20] 赵亚芳,李郁茹,陈玉民,等. 环留行炭纳米类成分发现及其对小鼠酒精性肝损伤保护作用[J]. 中草药, 2021, 52(22): 6825-6833.

[21] 周光德,赵景民. 不同病因致肝纤维化/肝硬化的病理特点[J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(6): 1086-1091.

[22] SEKI E, BRENNER D A. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015, 22(7): 512-518.

[23] GEREMIAS A T, CARVALHO M A, BOROJEVIC R, et al. TGF beta1 and PDGF AA override collagen type I inhibition of proliferation in human liver connective tissue cells[J]. BMC Gastroenterol, 2004, 4: 30.

[24] TACKE F, TRAUTWEIN C. Mechanisms of liver fibrosis resolution[J]. J Hepatol, 2015, 63(4): 1038-1039.

[25] PEDERSEN H D, GALSGAARD E D, CHRISTOFFERSEN B O, et al. NASH-inducing diets in gottingen minipigs[J]. J Clin Exp Hepatol, 2020, 10(3): 211-221.

[26] 崔鲜伟,邓桂明,欧阳林旗,等. 纳米脂质体制剂提高苦参碱去活化肝星状细胞作用研究[J]. 药物评价研究, 2021, 44(1): 63-69.

(收稿日期:2021-11-10 修回日期:2022-02-20)
(编辑:曾海蓉)