

槲皮素对溶酶体内活性铁介导的酒精性肝损伤的保护作用

李艳艳¹ 陈 嫚¹ 禹 晓¹ 徐岩岩¹ 唐玉涵¹ 姚 平^{1*}

(1. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生学系, 武汉 430030)

摘要 目的: 探讨溶酶体内活性铁在酒精所致肝脏氧化损伤中的作用及槲皮素的拮抗机制。**方法:** 等能量配对喂养雄性 C57BL/6J 小鼠 15 周建立酒精继发性铁过载模型, 同时灌胃槲皮素及腹腔注射脱铁铵 (DFO) 进行干预。检测血清转氨酶、肝脏氧化损伤与铁水平相关指标及溶酶体稳定性。乙醇 (100 mmol/L) 孵育经 FeCl₃、DFO 及槲皮素干预后小鼠原代肝细胞 24 小时, 测定溶酶体内活性铁含量并分析肝细胞的损伤水平。**结果:** 与正常对照组相比, 长期酒精喂养明显引起小鼠肝脏氧化损伤, 同时肝脏总铁含量、可变铁池 (LIP) 水平、溶酶体内活性铁水平、铁蛋白轻链 (Ft-L) 及瞬时受体潜在粘脂蛋白 (TRPML1) 表达显著升高, 而溶酶体膜稳定性显著降低。槲皮素干预有效改善酒精引起的肝脏铁过载与氧化损伤, 并不同程度的降低酒精所致 Ft-L、TRPML1 的异常高表达, 提高溶酶体膜稳定性。减少溶酶体内铁减轻酒精引起的肝细胞氧化损伤而增加溶酶体内铁加重这种损伤。**结论:** 溶酶体内活性铁在酒精性肝损伤中发挥重要的作用, 槲皮素通过降低溶酶体内活性铁减轻酒精引起的肝脏氧化损伤。

关键词 酒精性肝病; 槲皮素; 溶酶体活性铁; 氧化损伤

The Protective Effects of Quercetin In Lysosome Redox Active Iron-mediated Alcoholic Liver Injury

Abstract: Objectives: To investigate the role of lysosome redox active iron toxicity in ethanol-induced liver oxidative damage and the protective effects of quercetin. **Methods:** The male C57BL/6J mice were pair-fed with either regular or ethanol-containing Lieber De Carli liquids diets for 15 weeks. At the same time, quercetin and DFO were received by gavage and intraperitoneal injections respectively according to the body weight. The leakage of transaminases, together with hepatic redox and iron-related parameters, and lysosomal damage were assayed. **Results:** Compared with normal control, intracellular iron, hepatic LIP and intralysosomal iron were significantly increased in ethanol-exposed mice liver, accompanying the sustained oxidative damage. The hepatotoxicity was relieved by reducing lysosomal iron while aggravated by escalating lysosomal iron. Quercetin substantially alleviated the lysosomal iron-mediated alcoholic liver injury by normalizing ethanol stimulated the increase of ferritin light chain (Ft-L) and the typr IV mucopolipidosis-associated protein (TRPML1) expression and extenuating lysosomal membrane permeabilization (LMP). **Conclusion:** Lysosomal redox-active iron played a major role in ethanol elicited liver oxidative damage. quercetin exhibits powerful protection against alcoholic liver damage by lowering intralysosomal redox-active iron pool and consequent the mitigation of lysosome damage.

* 第一作者: 李艳艳, E-mail: lyhust@126.com, Tel: 15902795166

通讯作者: 姚平, E-mail: yaoping@mails.tjmu.edu.cn, Tel: 027-83692711

Keywords: alcoholic liver diseases; quercetin; intralysosomal redox active iron; oxidative stress

1 前言

由于过量饮酒所致的酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 发病率逐年上升, 已成为仅次于病毒性肝炎的第二大类肝病^[1]。酒精性肝损伤涉及多种机制, 其中, ROS 介导的氧化应激在 ALD 发生发展中起关键性作用。随着研究的深入, 人们惊奇地发现, 作为必需微量元素的铁反而与酒精一起表现出协同促氧化毒性。近年来, 临床和实验室研究发现, 长期酒精摄入会引起肝脏铁过载及 LIP-Fe (也被认为是“游离”铁) 水平升高, 细胞内过量的“游离”铁通过催化 Fenton 反应产生氧化毒性更强的羟自由基 ($\cdot\text{OH}$), 从而加重肝细胞的氧化损伤^[2]。溶酶体因降解铁蛋白、衰老的线粒体等含铁大分子物质而含有大量低分子质量的 Fenton 活性铁。越来越多的研究表明, 溶酶体内活性铁可能是细胞 LIP 的主要来源并在细胞氧化损伤中起到关键性作用^[3], 溶酶体靶向性铁螯合剂 DFO 可以减轻细胞氧化损伤。然而, 溶酶体内铁是否在酒精性肝损伤中发挥重要的作用尚不清楚。

DFO 被普遍应用于铁螯合的治疗, 但因安全性和副作用而受到诸多限制^[4]。因此, 天然无毒的铁螯合剂受到越来越多的关注。槲皮素 (Quercetin) 是自然界分布广泛的天然黄酮类化合物, 具有广泛的生物活性。大量研究显示, 槲皮素对铁具有较强的螯合能力, 并能有效清除细胞内游离铁诱导产生的 $\cdot\text{OH}$, 藉此发挥间接但可能是更为有效的抗氧化作用^[5]。我们前期研究和其他研究显示, 槲皮素对铁、酒精诱导的氧化应激无论在细胞还是动物水平上均有良好的保护作用^[6,7]。此外, 槲皮素还可通过调节溶酶体酶的活性发挥其对多种疾病的拮抗效应^[8], 提示槲皮素对酒精性肝损伤的保护作用可能是通过螯合溶酶体内活性铁。因此, 我们通

过此研究来证明溶酶体内活性铁在 ALD 发病中的作用及槲皮素的拮抗效应机制。

2 材料与方法

2.1 主要试剂

槲皮素 (Quercetin, 纯度 $\geq 95\%$)、脱铁铵 (DFO)、IV 型胶原酶 (Collagenase IV) 及吡啶橙 (AO) 均为美国 sigma 公司产品, 其他试剂均为国产 AR 级。Ferritin 及 TR-PML1 抗体分别购自英国 Abcam 和美国 Pierce 公司。转氨酶与 ROS 测定试剂盒分别购自深圳迈瑞和碧云天生物技术研究所以。

2.2 动物模型的建立

健康雄性 C57BL/6J 小鼠 (18-22g) 适应性喂养一周后, 按体重随机分为 6 组 (15 只/组): 正常对照组 (C, Lieber De Carli 液体饲料)、酒精组 (E, 含乙醇供能 30% 的 Lieber De Carli 液体饲料)、酒精+槲皮素组 (EQ, 槲皮素: 100mg/kg. bw)、槲皮素对照组 (Q)、酒精 + DFO 组 (ED, DFO: 100mg/kg · bw)、DFO 对照组 (D)。各组小鼠等能量配对连续喂养 15 周后, 隔夜停食后眼球取血分离血清并迅速分离肝脏样本, 保存于 -80°C 。

2.3 细胞分离与培养

参照 Selgen^[9]方法, 采用二步胶原酶灌注技术分离小鼠原代肝细胞, 经台盼蓝染色鉴定后 (细胞存活率 $> 90\%$) 接种于细胞培养板中, 于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 恒温培养箱中, 细胞贴壁后, 根据实验目的加入各种受试物。

2.4 指标的测定

2.4.1 肝细胞氧化损伤及溶酶体损伤的测定

采用酶动力学法测定小鼠血清 AST、ALT 及细胞上清 AST、LDH 的含量; 测定肝脏 10% 匀浆液上清 GSH (DTNB 改良法) 和

MDA (TBA 比色法); 肝组织 ROS 测定: 肝脏冰冻切片用 5 μM 的 DHE 于 37°C 避光孵育 15 min, 用 PBS 冲洗 3 遍后, 荧光显微镜下 (20 \times) 观察观察红色荧光强度; 按照试剂盒说明书测定肝组织羟自由基的产生; 肝细胞 ROS 测定: 受试物孵育细胞后, 加入 DCFH-DA (10 μmol) 于 37°C 孵育 30 min, 用 PBS 冲洗 3 遍, 在荧光酶标仪上检测其荧光强度 (Ex: 485nm, Em: 525nm); 溶酶体膜稳定性测定: 吖啶橙 (AO; 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 孵育细胞 15min (37°C) 后, 用荧光显微镜蓝光激发检测荧光, 红色荧光代表完好的溶酶体。

2.4.2 铁相关指标的测定

肝脏总铁的测定: 冲洗血液后的肝脏于 180°C 烤干后, 称重并用混合酸 (稀硝酸: 高氯酸 = 1 : 3) 消化, 蒸馏水定容至 5ml 后, 用火焰原子吸收分光光度仪测定中铁浓度, 根据标准曲线计算肝脏总铁含量。肝脏 LIP 测定: 冲洗血液后的肝脏称重后 2.5% 的比例于 1 mM 的 EDTA 中匀浆, 上清经 30 Kda 的超滤管过滤后用火焰原子吸收分光光度仪测定中铁浓度。溶酶体内活性铁的测定: 采用改良的硫银法。细胞爬片后用 2%

戊二醛固定, 1% (w/v) 硫化铵乙醇溶液硫化细胞, 蒸馏水冲洗 5 次后, 用含有乳酸银的阿拉伯胶溶液避光染色 30min, 经乙醇梯度脱水后显微镜拍照。Ft-L 及 TRPML1 的表达: Western blot 法检测, 采用改良 Lowry's 法测定蛋白浓度。

2.5 统计学分析

实验结果用 mean \pm SD 表示, 应用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)。

3 结果

3.1 槲皮素及 DFO 减轻长期酒精喂养小鼠的肝脏氧化损伤

如 Fig. 1 所示, 与正常对照组相比, 长期酒精喂养小鼠肝细胞 ALT、AST 漏出水平明显升高, 肝脏 GSH 水平显著降低而脂质过氧化产物 MDA、ROS 的产生显著上升 ($P < 0.05$)。槲皮素及 DFO 的干预不同程度减轻了酒精引起的 ALT、AST 释放, 同时缓解了小鼠肝脏的氧化损伤 ($P < 0.05$)。而槲皮素及 DFO 对正常小鼠转氨酶的释放及肝细胞氧化应激水平无明显影响。

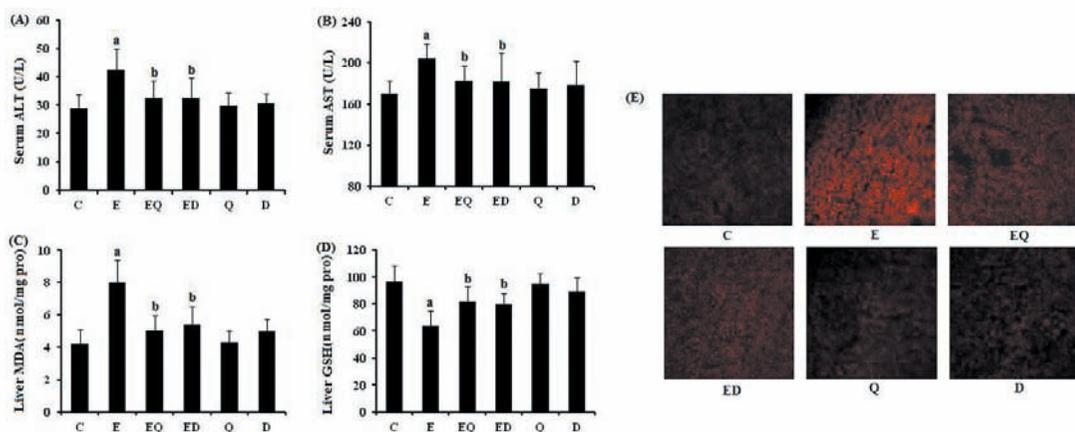


Fig. 1 The effect of quercetin and DFO on the mice liver oxidative damage delivered by chronic alcohol consumption.

C: control; E: ethanol; EQ: ethanol plus quercetin; ED: ethanol plus DFO; Q: quercetin; D: DFO. a: $P < 0.05$ versus the control; b: $P < 0.05$ versus the ethanol group.

3.2 槲皮素对长期酒精摄入引起的小鼠肝脏铁代谢紊乱的影响

如 Fig. 2 所示, 与正常对照组相比, 长期酒精单独暴露小鼠肝脏组织总铁含量及 LIP-Fe 分别升高 1.4 倍和 1.5 倍, 同时, 肝细胞内银颗粒沉积显著增加表明溶酶体内活

性铁含量上升。槲皮素及 DFO 干预后, 肝脏总铁含量、LIP 及溶酶体内活性铁水平明显降低 ($P < 0.05$)。值得注意的是, 槲皮素对正常小鼠肝脏铁含量无明显影响, 而 DFO 显著降低正常小鼠肝脏中铁含量、LIP 水平 ($P < 0.05$)。

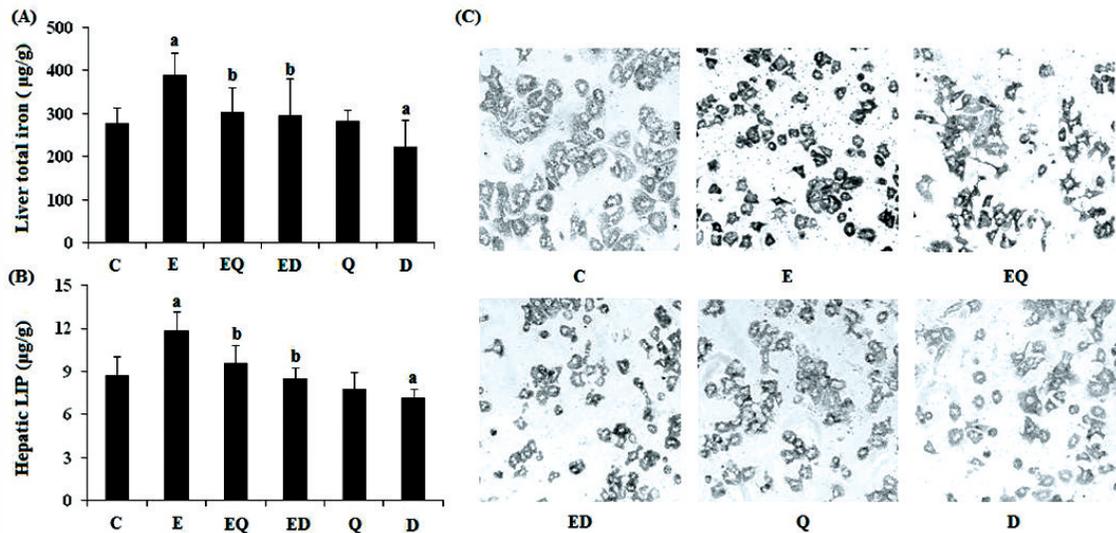


Fig. 2 Quercetin decreased liver total iron, LIP and intralysosomal redox active iron as well as DFO.

C: control; E: ethanol; EQ: ethanol plus quercetin; ED: ethanol plus DFO; Q: quercetin; D: DFO. a: $P < 0.05$ versus the control; b: $P < 0.05$ versus the ethanol group.

为了确定溶酶体内活性铁在酒精性肝脏氧化损伤中的作用, 我们用 FeCl_3 及靶向性铁螯合剂 DFO 孵育小鼠原代肝细胞 4 小时后, 加入乙醇孵育 24h。由 Fig. 3 可见, 与酒精组相比, FeCl_3 显著增加溶酶体内活性铁, 与此同时, 肝细胞 AST、LDH 漏出及 ROS 的产生显著增加 ($P < 0.05$), 溶酶体膜稳定性降低。相反的, DFO 及槲皮素显著减少溶酶体内活性铁, 肝细胞氧化损伤也随之明显减轻 ($P < 0.05$), 溶酶体膜稳定性增加。

3.3 槲皮素对溶酶体膜透性、铁蛋白及 TRPML1 表达的影响

为了探讨槲皮素降低溶酶体内活性铁从

而减轻酒精性肝损伤的相关机制, 我们测定了肝脏 Ft-L、TRPML1 及溶酶体膜透性 (lysosomal membrane permeabilization, LMP)。如 Fig. 4 所示, 与正常对照组相比, 长期酒精喂养小鼠肝脏中 Ft-L 和 TRPML1 分别上升了 3.3 倍和 2.9 倍, 槲皮素干预部分的逆转了它们的异常增加。此外, 慢性酒精暴露小鼠肝细胞经 AO 染色后显示出弥漫性的绿色荧光, 表明酒精引起了溶酶体膜通透性显著增加, 槲皮素干预后, 红色荧光增强, 溶酶体膜透性趋于正常。槲皮素对正常小鼠肝脏 Ft-L 和 TRPML1 的表达及溶酶体膜透性无明显影响。

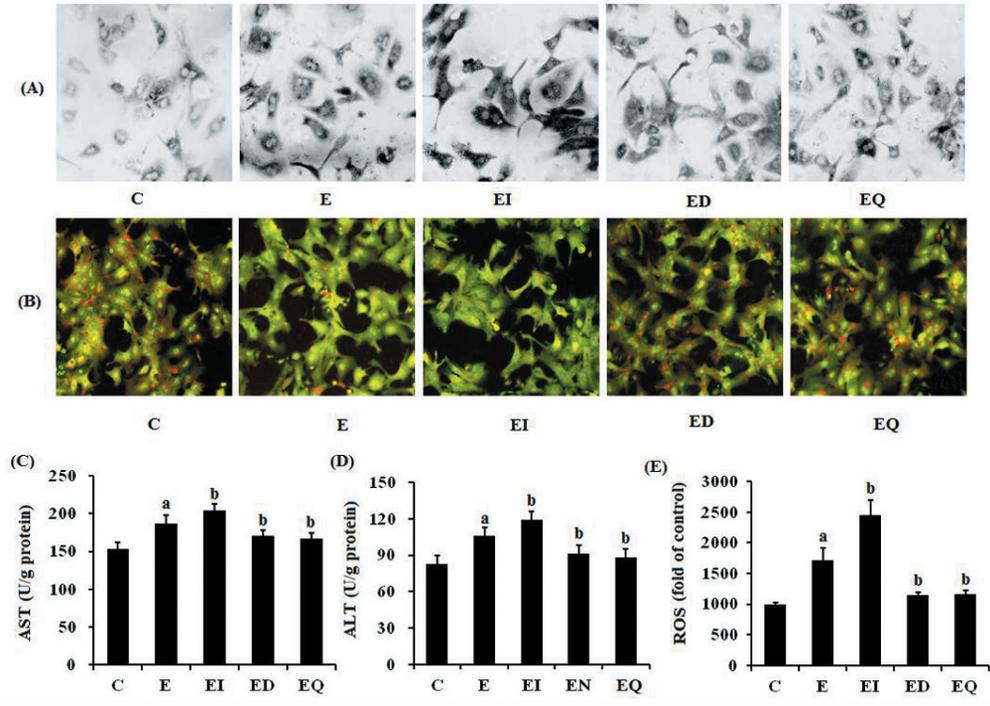


Fig. 3 The intralysosomal redox-active iron played an important role in ethanol induced hepatic damage. C: control; E: ethanol; EI: ethanol plus FeCl₃; ED: ethanol plus DFO; EQ ethanol plus quercetin. a: *P*<0.05 versus the control; b: *P*<0.05 versus the ethanol group.

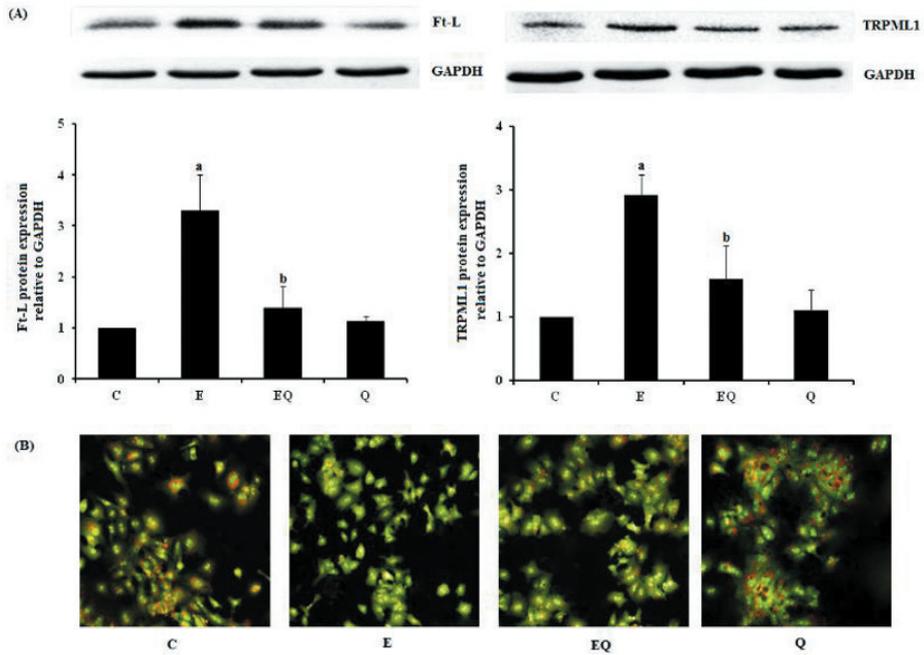


Fig. 4 Quercetin partially normalized ferritin light chain and TRPML1 expression and ameliorated lysosomal membrane permeabilization (LMP) triggered by ethanol. C: control; E: ethanol; EQ: ethanol plus quercetin; Q: quercetin. a: *P*<0.05 versus the control; b: *P*<0.05 versus the ethanol group.

4 讨 论

ALD 是因摄入过量酒精所导致的肝脏脂肪变性、肝炎、肝纤维化、肝硬化等一系列病变，并常常伴有肝脏铁异常蓄积^[10]。过量的铁与酒精一起表现出协同促氧化毒性，加重肝脏损伤。因此，铁过载亦成为 ALD 发展进程中的关键性危险因子。本实验研究发现，小鼠长期摄入酒精后，肝脏出现明显的铁沉积并伴有严重的氧化损伤。更为重要的是，目前研究一致认为铁过载是诸多慢性疾病中的危险因素，归因于铁过载中过量的“游离”铁（或者说是具有氧化还原活性的 Fe^{2+} ）催化 Fenton/Haber-Weiss 反应产生大量的毒性极强的 $\cdot\text{OH}$ 。溶酶体持续性降解含铁大分子物质（铁蛋白、线粒体等）而聚集大量的铁。溶酶体内的低 PH 值环境且含有大量还原剂（如谷胱甘肽、抗坏血酸等）使得这些铁以 Fe^{2+} 形式存在，因此 Fenton 反应可能主要发生在溶酶体中^[11]。大量证据显示，溶酶体内活性铁介导的氧化损伤在包括神经退行性病变、动脉粥样硬化和糖尿病等多种疾病中发挥着主要的作用^[3]。我们的实验发现，长期酒精暴露小鼠肝细胞溶酶体内活性铁显著增加，提示其可能在 ALD 的发生发展中发挥重要作用。为了进一步证明溶酶体内活性铁在酒精性肝氧化损伤中的病理生理学意义，我们采取耗竭或增加酒精孵育的小鼠原代肝细胞溶酶体内铁的方法，结果发现，DFO 通过整合溶酶体内铁从而明显减轻酒精诱导的肝脏氧化损伤，而 FeCl_3 （通过内吞作用进入溶酶体）则明显加重了酒精诱导的肝细胞氧化损伤。并且在动物实验中给予 DFO 干预后，伴随着溶酶体内活性铁的降低，小鼠肝脏损伤也显著减轻。由此可见，溶酶体内活性铁介导的氧化应激可能在 ALD 中发挥着关键性作用。因此，通过降低溶酶体内活性铁来减轻细胞对氧化应激的敏感性可能成为预防与治疗 ALD 的新策略。

DFO 是常用的溶酶体靶向铁螯合剂，但

其易在溶酶体内蓄积而对肝脏铁代谢产生不良影响，在我们的实验中也发现 DFO 干预引起正常小鼠肝脏中铁含量减少，因此，DFO 并不是良好的铁螯合剂。令我们兴奋的是，作为天然的多酚类物质的槲皮素已被证明是一种安全有效的铁螯合剂^[12]。槲皮素能够通过葡萄糖转运蛋白（GLUTs）^[13]自由穿过细胞膜，螯合细胞内的铁离子形成槲皮素-铁复合物而转运到细胞外，从而清除细胞内“游离”铁催化产生 $\cdot\text{OH}$ 。在我们的实验中，槲皮素不仅能够降低长期酒精喂养小鼠肝脏中的铁沉积而且减少了肝细胞溶酶体内的活性铁，从而抑制过量 ROS（尤其是 $\cdot\text{OH}$ ）的产生。

为了进一步探讨槲皮素如何缓解溶酶体内活性铁介导的酒精性肝损伤，我们检测了溶酶体内活性铁的来源与释放相关机制。铁蛋白（ferritin）是细胞中最主要的储铁蛋白，肝脏中主要表达储铁能力强的轻链铁蛋白（Ft-L）^[14]。目前研究认为，铁蛋白主要在溶酶体内降解，因而是溶酶体内活性铁的主要来源^[15]。在我们的实验中，长期酒精喂养小鼠肝脏中 Ft-L 表达显著升高，这也许是机体通过刺激铁蛋白的表达而结合多余的铁的一种自我保护机制。此外，有研究指出，铁蛋白进入溶酶体时会结合溶酶体内活性铁而发挥短暂的保护效应^[16]，但我们仍然认为过量铁蛋白的降解是酒精引起溶酶体内活性铁上升的主要因素，因在酸性的溶酶体腔内，铁蛋白结合铁的能力非常弱。槲皮素干预使酒精诱导的 Ft-L 表达趋于正常，这可能部分的解释槲皮素降低溶酶体内活性铁的水平。TR-PML1 是溶酶体上的二价铁离子通道，可以介导溶酶体铁离子释放到胞浆 LIP 中^[17]，增加细胞对氧化应激的敏感性。此外，溶酶体内活性铁催化产生的 $\cdot\text{OH}$ 攻击溶酶体膜造成其通透性增加，溶酶体内活性铁直接释放到胞浆 LIP 中。此外，溶酶体内含物如 H^+ 、蛋白水解酶等释放到胞浆中引起胞浆铁蛋白铁离子的释放而升高 LIP^[11]。有研究发现，紫外照射引起的溶酶体损伤是细胞 LIP 增加的重

要因素, 儿茶素(黄酮类化合物)通过减轻溶酶体膜破裂及减少铁蛋白的降解发挥抑制紫外照射导致的LIP升高^[18]。我们的研究显示, 降低长期酒精暴露小鼠肝脏TRPML1的异常高表达、减轻溶酶体膜通透性, 可能是槲皮素降低肝脏LIP水平从而缓解酒精性肝脏氧化损伤的潜在机制。

综上所述, 溶酶体内活性铁在酒精诱导的肝脏氧化性损伤中发挥关键性作用。槲皮素通过降低溶酶体内活性铁来减轻溶酶体的损伤, 进而在酒精性肝损伤中发挥有效的保护作用。本研究为槲皮素防治ALD提供新的理论基础, 但其确切机制尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Dey A, Cederbaum A I. Alcohol and oxidative liver injury [J]. *Hepatology*. 2006, 43 (2 Suppl 1): S63-S74.
- [2] Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, et al. Iron accumulation in alcoholic liver diseases [J]. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005, 29 (11 Suppl): 189S-193S.
- [3] Yu Z, Persson H L, Eaton J W, et al. Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death [J]. *Free Radic Biol Med*. 2003, 34 (10): 1243-1252.
- [4] Alymara V, Bourantas D, Chaidos A, et al. Effectiveness and safety of combined iron-chelation therapy with deferoxamine and deferiprone [J]. *Hematol J*. 2004, 5 (6): 475-479.
- [5] Baccan M M, Chiarelli - Neto O, Pereira R M, et al. Quercetin as a shuttle for labile iron [J]. *J Inorg Biochem*. 2012, 107 (1): 34-39.
- [6] Tang Y, Li Y, Yu H, et al. Quercetin attenuates chronic ethanol hepatotoxicity: Implication of "free" iron uptake and release [J]. *Food Chem Toxicol*. 2014, 67C: 131-138.
- [7] Li Y, Deng Y, Tang Y, et al. Quercetin protects rat hepatocytes from oxidative damage induced by ethanol and iron by maintaining intercellular labile iron pool [J]. *Hum Exp Toxicol*. 2014, 33 (5): 534-541.
- [8] Chougala M B, Bhaskar J J, Rajan M G, et al. Effect of curcumin and quercetin on lysosomal enzyme activities in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Clin Nutr*. 2012, 31 (5): 749-755.
- [9] Garner B, Roberg K, Brunk U T. Endogenous ferritin protects cells with iron-laden lysosomes against oxidative stress [J]. *Free Radic Res*. 1998, 29 (2): 103-114.
- [10] Petersen D R. Alcohol, iron-associated oxidative stress, and cancer [J]. *Alcohol*. 2005, 35 (3): 243-249.
- [11] Kurz T, Terman A, Gustafsson B, et al. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*. 2008, 1780 (11): 1291-1303.
- [12] Leopoldini M, Russo N, Chiodo S, et al. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin [J]. *J Agric Food Chem*. 2006, 54 (17): 6343-6351.
- [13] Vlachodimitropoulou E, Sharp P A, Naftalin R J. Quercetin-iron chelates are transported via glucose transporters [J]. *Free Radic Biol Med*. 2011, 50 (8): 934-944.
- [14] Friedman A, Arosio P, Finazzi D, et al. Ferritin as an important player in neurodegeneration [J]. *Parkinsonism Relat Disord*. 2011, 17 (6): 423-430.
- [15] Kidane T Z, Sauble E, Linder M C. Release of iron from ferritin requires lysosomal activity [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006, 291 (3): C445-C455.
- [16] Kurz T, Eaton J W, Brunk U T. The role of lysosomes in iron metabolism and recycling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011, 43 (12): 1686-1697.