Modern Practical Medicine, February 2024, Vol. 36, No. 2

·论 著·

体外不同条件诱导 L02 肝细胞损伤模型的构建

姜晓杰，潘金明，琚立萍，张晶，孙晶晶，庄思静，席建军，庄让笑

【摘要】目的 探讨不同条件下诱导 L02 肝细胞损伤的最佳条件，建立稳定可靠的体外肝细胞损伤模型。**方法** 将常规培养的L02细胞分别设置为正常对照组、过氧化氢（H_2O_2）组、对乙酰氨基酚（APAP）组和乙醇组；H_2O_2 组用不同浓度梯度（300、400、500 和 600 μmol/L）的 H_2O_2 分别诱导 6、12 和 16 h；APAP 组以不同浓度梯度（1、10、20 和 40 mmol/L）分别诱导 3 和 6 h；乙醇组加入不同浓度梯度（0.5%、1%、1.5%和 2%）的乙醇分别孵育 6 和 24 h；在上述损伤条件下用细胞计数试剂盒（CCK）-8 检测各组 L02 细胞的存活率。在确定的最佳损伤条件下，建立不同肝损伤模型，检测丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙二醛（MDA）和超氧化物歧化酶（SOD）等损伤指标。**结果** 除 300 μmol/L H_2O_2 诱导 12 h 以外，其余不同浓度 H_2O_2 组的细胞存活率均低于正常对照组（均 $P < 0.05$）。不同浓度 APAP 组的细胞存活率均低于正常对照组（均 $P < 0.05$），尤其是 40 mmol/L 的 APAP 更为明显。乙醇诱导 6 h 后，不同浓度乙醇组的细胞存活率均明显下降，1.5%和 2%乙醇的细胞存活率均低于正常对照组（均 $P < 0.05$）；此外，不同浓度的乙醇诱导 24 h 可以引起 L02 细胞大量坏死。H_2O_2 模型组、APAP 模型组和乙醇模型组的细胞存活率、SOD 活性均低于正常对照组（均 $P < 0.05$），而 ALT、AST、MDA 含量均高于正常对照组（均 $P < 0.05$）。**结论** 分别用 300 μmol/L H_2O_2 诱导 6 h、40 mmol/L APAP 作用 3 h 和 1.5%的乙醇作用 6 h 的 L02 肝细胞所形成的肝损伤模型比较稳定，是体外模拟氧化性、药物性和酒精性肝损伤模型的最佳诱导条件。

【关键词】 L02 肝细胞；过氧化氢；对乙酰氨基酚；乙醇；肝细胞损伤
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.03.004
【中图分类号】 R657.3 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-0800(2024)02-0154-05

Establishment of liver cell injury model induced by different conditions in vitro

JIANG Xiaojie, PAN Jinmin, JU Liping, ZHANG Jing, SUN Jingjing, ZHUANG Sijing, XI Jianjun, ZHUANG Rangxiao (Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, Zhejiang, China)

【Abstract】Objective To study the optimum conditions of the L02 hepatocytes injured under different conditions, and establish a stable and reliable model of hepatocytes injured in vitro. **Methods** The L02 hepatocytes were divided into the normal control group, hydrogen peroxide (H_2O_2) group, Acetaminophen (APAP) group andethanol group. In the H_2O_2 group, the L02 hepatocytes were treated with different concentration gradient of H_2O_2 (300, 400, 500 and 600 μmol/L) for 3, 12 and 16 h, respectively. In the APAP group, APAP with different concentration gradients (1, 10, 20 and 40 mmol/L) was induced for 3 and 6 h, respectively. In the ethanol group, ethanol with different concentration gradients (0.5%, 1%, 1.5% and 2%) was induced for 6 h and 24 h, respectively. Cell viability was tested with cell counting kit (CCK)-8 among all the groups. Under the optimal injury conditions, different models of liver injury were established, and the indexes of liver injury such as malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were detected, and the stability of the models was verified. **Results** Compared to the normal control group, the other concentration of H_2O_2 had significant differences except 300 μmol/L of H_2O_2 induced for 12 h (all $P < 0.05$). Cell viability declined with increased APAP concentration and treatment time, especially with APAP at the concentration of 40 mmol/L ($P < 0.05$). Cell viability was obviously decreased in each concentration after 6 h ethanol treatment, espe-

基金项目： 浙江省基础公益研究计划项目（LGF21H300002）
作者单位： 310023 杭州，杭州市西溪医院
通信作者： 庄让笑，Email：zhuangrangxiao@sina.com

cially with ethanol at the concentration of 1.5% and 2% (all $P < 0.05$). In addition, a large percentage of L02 hepatocytes were died after 24 h treatment with different concentration gradient of ethanol. The cell survival rate and SOD activity of H_2O_2 group, APAP group and ethanol group were lower than those of the normal control group (all $P < 0.05$), while the contents of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and MDA were higher than those of the normal control group (all $P < 0.05$). **Conclusions**　The L02 hepatocytes separately treating with 300 μmol/L of H2O2 for 6 h, 40 mmol/L APAP for 3 h and 1.5% ethanol for 6 h are the stable and reliable models simulating the oxidative, drug-induced and alcoholic liver injury models in vitro.

【Key words】 L02 hepatocytes; Hydrogen peroxide; Acetaminophen; Ethanol; Hepatocytes damage

[Modern Practical Medicine,2024,36(2):154-158]

肝脏作为机体最重要的腺体，在机体新陈代谢、排毒以及胆汁的生成和排泄等方面起到至关重要的作用，肝脏容易受到如酒精、病毒、药物等多种外在因素的攻击而受到损伤，从而影响机体的健康[1-2]。临床常见肝损伤由于病因不同，常分为病毒性肝损伤、自身免疫性肝损伤、药物性、酒精性及化学性肝损伤等。而在多种肝脏疾病的肝细胞损伤中，氧化应激是他们的共同损伤机制，在肝损伤的发病过程中起到重要的作用[3]。

目前，药物性肝损伤模型常用的诱导剂主要有四氯化碳（CCl_4）、对乙酰氨基酚（APAP）等，两种诱导剂在过量的情况下均能够对肝脏产生损伤，APAP 更能模拟人类因服用过量药物而导致的肝损伤；而氧化性肝损伤常用的诱导剂为过氧化氢（H_2O_2），由于 H_2O_2 在体内释放大量的氧自由基破坏体内的氧化系统从而导致肝损伤，不同浓度的 H_2O_2 产生的肝损伤程度也较大。虽然建立各类肝损伤体内外模型较多，但缺乏统一的建模标准。合理的模型是研究肝损伤发生发展机制以及药物筛选的基石，因此，本研究通过体外培养 L02 人肝细胞，分别以不同浓度的过氧化氢（H_2O_2）、对乙酰氨基酚（APAP）和酒精诱导不同时间 L02 人肝细胞后，观察 L02 肝细胞的细胞存活率，摸索最佳的肝细胞损伤条件，建立稳定、可靠的 L02 体外肝细胞损伤模型，为后续相关机制研究、保肝药物的体外活性筛选等提供实验基础和依据，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器　人正常 L02 肝细胞（上海睿智化学研究有限公司），DMSO（Sigma，批号 52396AK），RPMI-1640 培养基（Invitrogen，批号 1234-12），胎牛血清（FBS，BIOSERA，批号 030813），BCA 蛋白浓度测定试剂盒（江苏碧云天生物技术研究所，批号 LF146255），细胞计数试剂盒（CCK-8，江苏碧云天生物技术研究所，批号 101416170109），丙二醛（MDA）检测试剂盒（江苏碧云天生物技术研究所，批号 041916160630），超氧化物歧化酶（SOD）活性检测试剂盒（江苏碧云天生物技术研究所，批号 051216160706），丙氨酸氨基转移酶（ALT）检测试剂盒（江苏碧云天生物技术研究所，批号 071315160811），天冬氨酸氨基转移酶（AST）检测试剂盒（江苏碧云天生物技术研究所，批号 091512160930），H_2O_2（Sigma，批号 52396AK），APAP（梯希爱化成工业发展有限公司，批号 103-90-2），乙醇（北京百灵威科技有限公司，批号 1610-5）。CO_2 细胞培养箱（美国 Thermo 公司），酶标仪（美国 Thermo 公司），低温离心机（德国 Eppendorf 公司），超净工作台（苏州苏洁净化设备公司），分析天平（德国 Sartorius 公司），96 孔板（美国 Corning 公司）。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养及分组　L02 细胞复苏后，用含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液转移至培养皿中，37 ℃、5% CO_2 条件下培养，每 2 ～ 3 天换液 1 次，取对数生长期的细胞用于实验，将 L02 细胞随机分为正常对照组和实验组（H_2O_2 组、APAP 组和乙醇组）。

1.2.2　不同条件诱导 L02 细胞损伤细胞存活率的检测

1.2.2.1　H_2O_2 诱导 L02 肝细胞损伤细胞存活率的检测　取对数生长期的 L02 细胞，按 2.5×10^5/ml 接种于 96 孔板，每孔 100 μl，接种 12 h 细胞完全贴壁后，正常组加入无 FBS 的培养基，H_2O_2 组分别加入不同浓度梯度（300、400、500 和 600 μmol/L）的 H_2O_2 且无 FBS 的 RPMI-1640 培养液，37 ℃、5% CO_2 条件下分

别孵育 6、12 和 16 h，用 CCK-8 检测 L02 细胞的存活率，设定正常对照组的细胞存活率为 100%，计算细胞存活率，每个浓度设 6 个复孔，取平均值。

1.2.2.2　APAP 诱导 L02 肝细胞损伤细胞存活率的检测　取对数生长期的 L02 细胞，按 2.5×10^5/ml 接种于 96 孔板，每孔 100 μl，接种 12 h 细胞完全贴壁后，正常组加入无 FBS 的培养液，APAP 组分别以不同浓度梯度（1、10、20 和 40 mmol/L）的 APAP 诱导 L02 细胞，在 37℃、5% CO_2 条件下分别培养 3 和 6 h 后，用 CCK-8 检测 L02 细胞的存活率，设定正常对照组的细胞存活率为 100%，每组设 6 个复孔，取平均值。

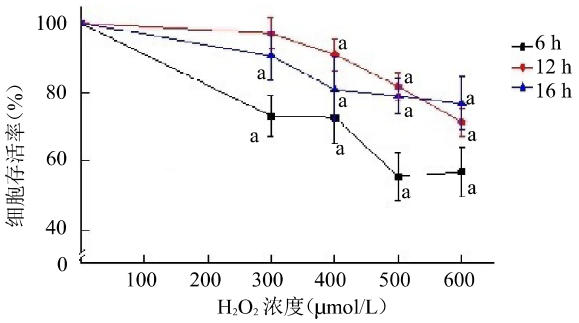
1.2.2.3　乙醇诱导 L02 肝细胞损伤细胞存活率的检测　取对数增长期的 L02 细胞按 2.5×10^5/ml 接种于 96 孔板，每孔 100 μl，接种 12 h 后细胞完全贴壁后，正常组加入无 FBS 的培养液，乙醇组分别加入不同浓度梯度（0.5%、1%、1.5%和 2%）的乙醇，在 37℃、5% CO_2 条件下孵育 6 和 24 h，用 CCK-8 检测 L02 细胞的存活率，设定正常对照组的细胞存活率为 100%，CCK-8 细胞活性检测按照说明书使用，应用酶标仪在 450 nm 处检测吸光度（A_{450}），计算细胞存活率，每个浓度设 6 个复孔，取平均值。

1.2.3　体外不同条件作用 L02 肝细胞损伤模型的建立　取对数生长期的 L02 细胞，按 2.5×10^5/ml 接种于 96 孔板，每孔 100 μl，接种 12 h 细胞完全贴壁后，正常组加入无 FBS 的培养基，H_2O_2 损伤组用 300 μmol/L 的 H_2O_2 诱导 6 h，APAP 损伤组用 40 mmol/L 的 APAP 作用 3 h，乙醇损伤组用 1.5%的乙醇作用 6 h，37 ℃、5% CO_2 条件下培养，用 CCK-8 检测各组 L02 细胞的存活率；严格按照试剂盒说明书操作，检测各组细胞培养上清中 ALT、AST、MDA 含量和 SOD 活性，每个浓度设 6 个复孔，取平均值。

1.3　统计方法　采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计处理，计量资料以均数±标准差表示，组间比较采用单因素方差分析，多重比较采用 LSD 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

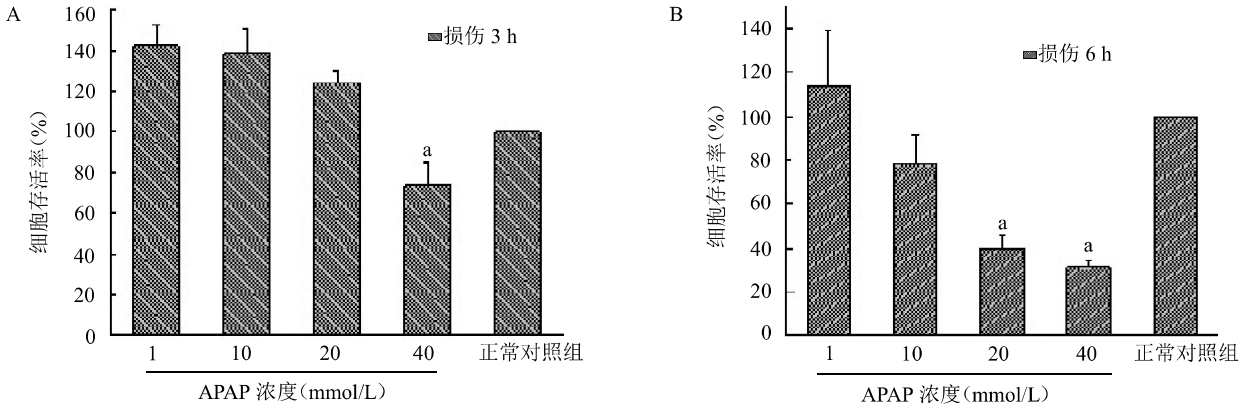
2　结果

2.1　不同浓度的 H_2O_2 诱导不同时间 L02 肝细胞存活率的比较　经过不同浓度的 H_2O_2 诱导 L02 肝细胞不同时间后，L02 肝细胞存活率有不同程度的降低，见图 1。与正常对照组比较，300 μmol/L 的 H_2O_2 诱导 12 h 后，L02 肝细胞存活率无明显变化（$P>0.05$），其余各组细胞在不同浓度的 H_2O_2 诱导不同时间后差异均有统计学意义（均 $P<0.05$）；在相同诱导时间下，随着 H_2O_2 浓度增加，L02 肝细胞存活率显著下降；而相同浓度的 H_2O_2 随着诱导时间的延长，L02 细胞



注：与正常对照组比较，a$P<0.05$

图 1　不同浓度 H_2O_2 诱导不同时间 L02 肝细胞存活率比较



注：A 为不同 APAP 浓度诱导 3 h 后 L02 细胞的存活率比较，B 为不同 APAP 浓度诱导 6 h 后 L02 细胞存活率比较，与正常对照组比较，a$P<0.05$

图 2　不同浓度 APAP 诱导不同时间 L02 肝细胞存活率比较

存活率有增加的趋势。考虑到试验时间的可操作性及细胞的承受能力，采用 300 μmol/L 的 H_2O_2 诱导 6 h 为氧化性肝细胞损伤建模的最佳条件。

2.2　不同 APAP 浓度诱导不同时间 L02 肝细胞存活率的比较　不同浓度 APAP 分别诱导 L02 肝细胞损伤 3 和 6 h 后，L02 细胞存活率逐渐降低，见图 2。在相同浓度的 APAP 诱导 L02 细胞时，随着造模时间的延长，L02 肝细胞的存活率逐渐下降，与正常对照组比较，40 mmol/L 的 APAP 作用 3 和 6 h 后，肝细胞存活率分别降至 33%和 72%左右，差异均统计学意义（均 $P < 0.05$）；20 mmol/L 的 APAP 作用 6 h 时，细胞存活率降至 39%左右，差异有统计学意义（$P < 0.05$），其余各组差异均无统计学意义（均 $P > 0.05$）。采用 40 mmol/L 的 APAP 诱导 L02 肝细胞 3 h 为药物性肝损伤模型的最佳诱导条件。

2.3　不同乙醇浓度作用不同时间 L02 肝细胞存活率的比较　当用不同浓度乙醇诱导 24 h 时，可能由于实验操作以及诱导 24 h 时已超出细胞的承受能力等因素，导致 L02 肝细胞大量坏死，导致参与统计的细胞组数不够，差异无统计学意义，因此不同浓度乙醇诱导 24 h 组的数据不纳入统计计算。当乙醇浓度为 1.5%和 2%诱导 6 h 时，细胞存活率显著下降，差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$），见图 3。采用 1.5%的乙醇诱导 L02 肝细胞 6 h 为酒精性肝损伤模型的最佳建模条件。

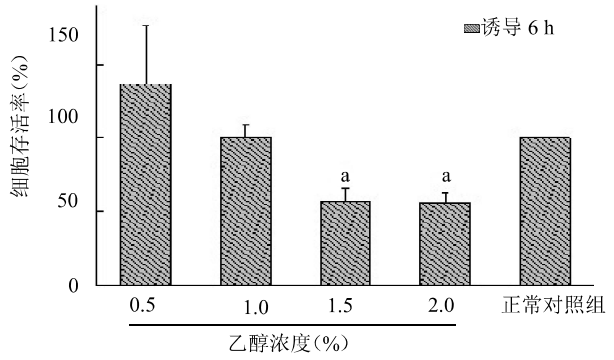
2.4　体外 L02 肝细胞损伤模型各组细胞存活率比较　H_2O_2 模型组、APAP 模型组和乙醇模型组的细胞存活率均低于正常对照组（均 $P < 0.05$），见图 4。

2.5　体外 L02 肝细胞损伤模型 ALT、AST、MDA 和 SOD 指标比较　H_2O_2 模型组、APAP 模型组和乙醇模型组的 ALT、AST、MDA 含量均高于正常对照组（均 $P < 0.05$），而 SOD 活性均低于正常对照组（均 $P < 0.05$），见表 1。

3　讨论

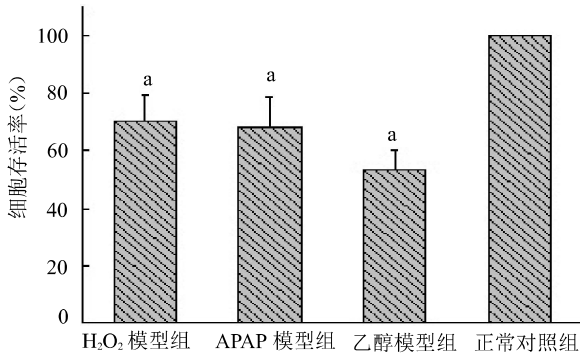
肝细胞损伤是由各种因素引起的多种肝脏疾病的共同病变基础和表现，而内源性活性氧（ROS）引发的氧化应激是肝损伤最重要的发病机制[4]。正常情况下，机体内抗氧化系统能够维持细胞内氧自由基的代谢平衡，但当肝细胞受到大量氧自由基的攻击，机体氧化平衡系统被打破，造成细胞膜和细胞结构的破坏，导致肝细胞肿胀坏死，进一步使细胞内清除自由基酶的活性下降，使肝细胞损伤进一步加重[5-6]。

氧化性肝损伤主要是一些药物及活性氧在肝脏内生成大量的 ROS 引起组织内氧化-还原失衡，



注：与正常对照组比较，a$P < 0.05$

图 3　不同乙醇浓度诱导 6 h 后 L02 肝细胞损伤的细胞存活率比较



注：与正常对照组比较，a$P < 0.05$

图 4　不同条件诱导 L02 肝细胞损伤的细胞存活率比较

表 1　各组细胞 ALT、AST、MDA 含量和 SOD 活性结果

组别	ALT（U/L）	AST（U/L）	MDA（U · mg^{-1} · $prot^{-1}$）	SOD（μmol · mg^{-1} · $prot^{-1}$）
正常对照组	6.94±1.67	15.61±2.26	1.18±0.54	1.78±0.13
H_2O_2 模型组	18.54±2.34[a]	36.91±1.88[a]	4.83±0.36[a]	1.55±0.2[a]
APAP 模型组	25.33±3.27[a]	47.22±1.35[a]	4.19±0.14[a]	1.08±0.10[a]
乙醇模型组	20.19±1.44[a]	41.18±2.73[a]	5.93±0.73[a]	1.29±0.47[a]
F 值	68.93	252.20	97.02	7.54
P 值	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

注：与正常对照组比较，a$P < 0.05$

从而影响到肝脏内的抗氧化酶系统，使肝细胞功能发生紊乱，肝组织破坏而导致的一类肝损伤；而药物性肝损伤是药物在使用过程中，因药物本身或/及其代谢产物或由于特殊体质对药物的超敏感性或耐受性降低所导致的肝脏损，药物性肝损伤常常是药物研发失败、上市后被撤市或限制使用的主要原因之一；酒精性肝损伤即酒精性肝病是一种进行性发展严重影响身体健康的疾病，而且在世界范围内酒精性肝病的发病率呈逐年上升趋势。因此，建立合适的体内外肝损伤模型，对于深入研究肝损伤的发病机制、药物筛选等具有重要的研究意义。

H_2O_2 是一种重要的活性氧，能够穿透细胞膜使细胞内氧自由基增加，而且极易通过细胞膜与细胞内铁离子反应形成高活性羟基损伤肝细胞[7-8]；长期或过量服用APAP后，其代谢产物N-乙酰-对苯醌亚氨将肝细胞中的谷胱甘肽耗竭，进一步与线粒体和脂质膜中蛋白质共价结合，破坏线粒体功能而产生超氧阴离子、H_2O_2 等活性氧[9-10]；乙醇能够激活细胞色素 P450 活性，导致机体氧化应激的发生，产生ROS，在胞内酶作用下，生成大量超氧阴离子、羟基等自由基[11-13]。

本研究分别用不同浓度的 H_2O_2、APAP 和乙醇作为诱导剂，分别作用L02 人肝细胞不同时间后，采用 CCK-8 检测 L02 肝细胞的存活率，结果发现，不同条件诱导的 L02 肝细胞损伤细胞存活率降低，与正常对照组比较，用 300 μmol/L H_2O_2 诱导 6 h、40 mmol/L APAP 作用 3 h 和 1.5%的乙醇作用 6 h 处理的 L02 肝细胞存活率差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$），可作为 H_2O_2、APAP 和乙醇诱导 L02 肝细胞损伤的最佳条件。通过体外 L02 肝细胞损伤模型的建立，对所建立的 L02 肝细胞损伤条件进行验证，结果发现，H_2O_2 模型组、APAP 模型组和乙醇模型组细胞存活率均低于正常对照组（均 $P < 0.05$），ALT、AST、MDA 含量高于正常对照组，而 SOD 活性低于正常对照组（均 $P < 0.05$），这提示采用 300 μmol/L H_2O_2 诱导 6 h、40 mmol/L APAP 作用 3 h 和 1.5%的乙醇作用 6 h 的 L02 肝细胞，可作为不同肝细胞损伤模型的最佳诱导条件。

利益冲突　所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明　姜晓杰：论文撰写；潘金明、琚立萍、张晶：细胞培养及模型建立；孙晶晶、庄思静：数据整理、统计学分析；席建军、庄让笑：论文修改及审核

参 考 文 献

[1] HESAMI Z, JAMSHIDZADEH A, AYATOLLAHI M, et al. Effect of plateletrich plasma on CCl4-induced chronic liver injury in male rats[J]. Int J Hepatol,2014,2014:932930-932936.

[2] OYEYEMI I T, AKANNI O O, ADARAMOYE O A, et al. Methanol extract of Nymphaea lotus ameliorates carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats via inhibition of oxidative stress[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2017,28(1):43-50.

[3] 贺兰芝,孟雅坤,韩延忠,等.木犀草素对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.

[4] 琚立萍,席建军,赵艳梅,等.新型含二硫键和硫酯键的乙酰半胱氨酸衍生物的合成与抗肝损伤活性评价[J]. 中国现代应用药学,2018,35(3):340-344.

[5] 吴军,周春祥,赵凤鸣,等.麻黄连轺赤小豆汤三方对H2O2诱导损伤的L-O2人肝细胞的保护作用[J].中药新药与临床药理,2013,24(4):367-370.

[6] 李白雪,张技,吴疆,等.体外肝细胞损伤模型分子机制探讨[J].现代生物医学进展,2014, 14(9):1786-1788.

[7] 黄丽,符运舜,朱彩霞,等. 铁甲草含药血清对过氧化氢致肝细胞损伤保护作用研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(1):45-47.

[8] 刘红亮,胡磊,王靖凯,等.槲皮素对H2O2损伤PC12细胞的保护效果与机制[J].中国药理学通报,2014,30(3):373-377.

[9] 高平章,陈金珍,李安娜,等.黄芩苷对对乙酰氨基酚诱导小鼠肝损伤中蛋白质氧化及硝化的影响[J].华中科技大学学报(医学版),2015,44(1):64-68.

[10] 潘家琪,宋丹军,李鹏旭,等. 对乙酰氨基酚肝毒性机制与防治研究新进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2014,28(4):618-624.

[11] 朱慧玲,刘合生,戚向阳,等.罗汉果皂甙提取物对乙醇诱导L-02损伤的保护作用[J]. 中国食品学报,2015,15(1):13-18.

[12] 胡静,陈新祥,胡剑峰,等.姜黄素对乙醇诱导的人L-02肝细胞氧化损伤的保护作用研究[J].医学理论与实践,2013,26(1):3-4,7.

[13] 黄敏,薄红兵,王希,等.芍药苷对乙醇诱导L02细胞的毒性和氧化损伤保护机制的影响[J].中国临床药理学杂志,2014(11):1030-1032,1038.

收稿日期：2023-12-01

（本文编辑：孙海儿）