

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.21.017

茶多酚对酒精性肝损伤过氧化氧化的影响

唐袁婷¹,管小琴^{2△},江咏梅¹,岳新爱¹,陈平¹,彭英¹,玉洁¹

(1. 四川大学华西第二医院检验科,成都 610041;2. 重庆医科大学附属第一医院病理科 400016)

摘要:目的 建立酒精性肝损伤的细胞模型,研究茶多酚(TP)对酒精性肝损伤的调节作用。方法 通过细胞培养,采用显微镜观察细胞形态,检测细胞培养液丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)和细胞内活性氧(ROS)变化。结果 乙醇使 L02 肝细胞脂肪变性。与乙醇组比较,TP+乙醇组脂肪变性轻,其培养液中 ALT、AST、GGT 水平降低,细胞内 ROS 减少。结论 体外实验中茶多酚能减轻细胞脂肪变性程度,改善酶学指标,减少 ROS 的产生,来避免肝脏损害。

关键词:茶多酚;酒精性肝损伤;过氧化

中图分类号:R364

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)21-2736-03

Effect of tea polyphenols intake on ethanol-induced liver injury

Tang Yuanting¹, Guan Xiaoqin^{2△}, Jiang Yongmei¹, Yue Xinai¹, Chen Ping¹, Peng Ying¹, Yu Jie¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Second Hospital of West China, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To establish the cell model of ethanol-induced liver injury and explore the protective effects of tea polyphenols (TP) on ethanol-induced liver injury. **Methods** Cell morphology were observed by microscope, and then alanine aminotransferase (ALT), nmda transaminase (AST), gamma GGTP, GGT and ROS changes were detected. **Results** Alcohol maked L02 hepatocyte fatty degeneration. Compared with ethanol group, steatosis in TP + ethanol group was lighter, its ALT, AST, GGT content and intracellular ROS reduced. **Conclusion** TP can decrease cell fatty change degree in vitro experiments, improve the enzymology indexes, reduce the generation of reactive oxygen species to avoid liver damage.

Key words: tea polyphenols; ethanol-induced liver injury; ROS

2004 年全球 3.8% 的人类死于饮酒,乙醇会导致多器官的损伤,其中以肝脏损伤尤为显著,其发病机制复杂,较为公认的是氧化应激可能是酒精性肝损伤的驱动力^[1-5]。茶多酚(TP)是茶叶中提取的多酚类物质的总称,其分子结构中的连(邻)苯酚基,具有多种抗氧化协同作用,同时具有很强的体外抗肿瘤和抗炎效应^[6-9]。本研究用乙醇诱导永生生化肝正常细胞株 L02 脂肪变性,通过形态学和生化酶学,活性氧(ROS)指标来探讨 TP 对酒精性肝损伤的保护作用及其可能的机制。

1 材料与方

1.1 材料 L02 肝正常细胞株(重庆医科大学病毒性肝炎研究所细胞库),TP98(无锡世纪生物药业有限公司),RPMI 1640 培养液(GIBCO),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑盐(MTT)、油红 O(sigma),标准胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)试剂盒(南京建成生物工程),检测 ROS 试剂盒(碧云天生物技术)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及作用浓度的确定 L02 常规培养于 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,5% CO₂, 37 °C。选择对数生长期细胞进行试验。细胞 4.5 × 10⁴ 个/孔接种于 96 孔培养板孵育 24 h 后,加入不同浓度的乙醇溶液,使乙醇的终浓度为 0.6%、1.2%、2.4%、4.8%,损伤 24 h 后弃去培养板培养基,每孔加入 1640 培养液 180 μ L 和 5 mg/mL MTT 20 μ L 培养 4

h,弃上清液,每孔加入 200 μ L 二甲基亚砷(DMSO)振荡 15 min,选择酶联免疫检测仪(490 nm)测定各孔吸光密度值(OD 值),记录结果。TP 对酒精性脂肪变性 L02 细胞处理方式同上。TP 浓度为 100、200、400、500 μ g/mL。

1.2.2 分组 培养 24 h 细胞单层贴壁后分 3 组。对照组:常规培养 6 d;乙醇组:乙醇作用 3 d 后,常规培养 3 d;TP+乙醇组:同时加入乙醇和 TP 培养 3 d 后,常规培养 3 d。7 d 传代,每天换液,处理 4 周。

1.2.3 指标检测 参考文献[10]进行油红 O 染色,离心收集培养上清液全自动生化分析仪检测 ALT、AST、GGT,ROS 的测定按试剂盒说明书:分为原位装载探针荧光显微镜观察,收集细胞后装载探针荧光分光光度计(488 nm 激发波长,525 nm 发射波长)检测。

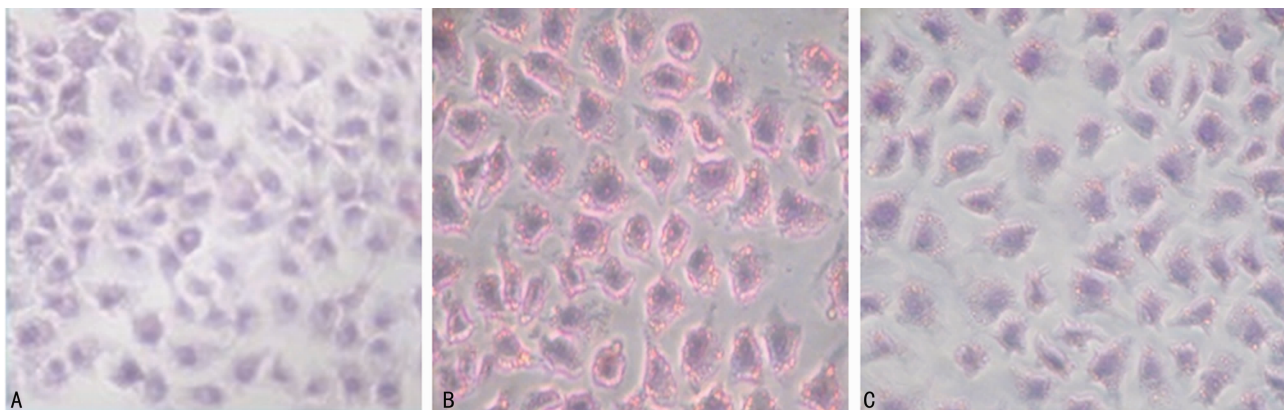
1.3 统计学处理 采用 SPSS11.5 软件进行数据分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组计量资料采用 One-way ANOVA 单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乙醇和 TP 最适作用浓度 不同乙醇浓度(0.6%、1.2%、2.4%、4.8%)对应的细胞相对活性分别为 83.33%、81.37%、65.69%、37.25%,结合文献[11]选择乙醇最适浓度为 0.6%。不同 TP 浓度(100、200、400、500 μ g/mL)对应的细胞相对活性分别为 113.17%、117.28%、82.59%、74.20%,结合文献[8],TP 作用最适浓度为 200 μ g/mL。

2.2 油红 O 染色各组脂肪滴情况的观察 对照组个别细胞可见少许单个小脂滴,乙醇组细胞质可见大量橘红色脂滴,

TP+乙醇组细胞脂滴小,数量少。见图 1。



A:对照组 B:乙醇组 C:TP+乙醇组。

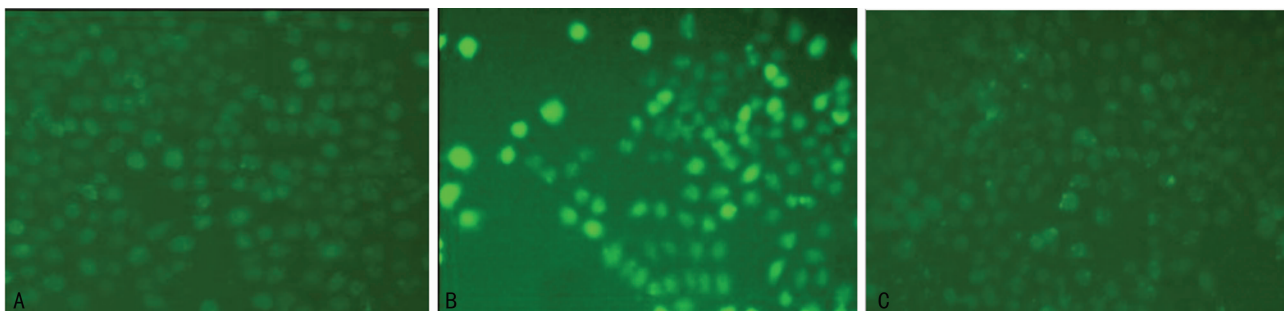
图 1 各组油红 O 染色情况(×400)

2.3 各组 ALT、AST、GGT 水平比较 TP+乙醇组的培养液上清中 ALT、AST、GGT 水平明显低于乙醇组($P<0.05$)。见表 1。

2.4 细胞内 ROS 的变化 对照组荧光微弱;乙醇组明显绿色荧光,最亮处位于细胞核周围;TP+乙醇组荧光较乙醇组减弱,见图 2。乙醇组 ROS 相对荧光值 99.63 ± 4.62 较对照组 34.17 ± 0.93 升高($P<0.05$),TP+乙醇组 58.63 ± 1.82 较乙醇组 99.63 ± 4.62 降低($P<0.05$)。

表 1 各组培养液上清中 ALT、AST、GGT 水平的变化($\bar{x} \pm s$, U/L)

| 组别 | ALT | AST | GGT |
|--------|------------------|-------------------|-----------------|
| 对照组 | 0.67 ± 0.58 | 8.00 ± 3.61 | 2.00 ± 1.00 |
| 乙醇组 | 10.67 ± 2.08 | 87.33 ± 43.50 | 4.67 ± 0.58 |
| TP+乙醇组 | 2.00 ± 1.00 | 11.00 ± 3.61 | 2.33 ± 0.01 |



A:对照组 B:乙醇组 C:TP+乙醇组。

图 2 各组细胞 ROS 荧光染色结果(×400)

3 讨论

L02 细胞是一种永生化的正常人类肝细胞株,具有正常肝细胞的某些特性,能够用于研究 TP 对乙醇诱导体外培养肝细胞的脂肪变性的作用。

肝细胞 ALT 主要存在于细胞质中;AST 大部分(70%)存在于细胞质和线粒体;GGT 分布在肝细胞膜,乙醇能诱导微粒体生物转化,使 GGT 升高,它们是肝细胞内非特异性功能酶,当细胞发生损伤时其值增加^[12-13]。乙醇及其代谢物乙醛能促进脂质过氧化和线粒体的损伤而引起肝细胞损伤使相关生化指标产生相应变化^[2,12-14],在动物实验中,TP 能防治酒精性肝损伤^[13-16]。文中乙醇组的细胞上清液酶学指标升高,TP 和乙醇同时培养后各指标下降,这与相关文献相符^[15-17]。

ROS 为含氧单电子,具有很强化学活性的细胞代谢产物,包括氧自由基、过氧化氢、羟基等,可用荧光探针 DCFH-DA 来检测。DCFH-DA 是非标记性的氧化敏感的荧光探针,细胞内

ROS 氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光的 DCF^[18]。本文利用荧光分光光度计和荧光显微镜检测 DCF 的荧光用以判定细胞内 ROS 水平,乙醇组 L02 细胞荧光强,细胞内 ROS 的水平高,可能是因为乙醇及其代谢物引起肝脏细胞的氧化应激反应^[11-17];同时加入 TP 培养细胞后 ROS 水平降低,荧光变弱,证实 TP 对酒精性肝损伤程度的减轻作用可能是通过抗氧化来实现的。

参考文献:

[1] Rehm J, Mathers C, Popova S, et al. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders[J]. Lancet, 2009, 373(960): 2223-2233.
 [2] Osama El, Feng H, Kim WH, et al. IL6-deficient mice are susceptible to ethanol-induced hepatic steatosis; IL-6 pro-

- fects against ethanol-induced oxidative stress and mitochondrial permeability transition in the liver[J]. *Cell Mol Immunol*, 2004, 1(3): 205-211.
- [3] Roede JR, Orliry DJ, Fisher AB, et al. Over-expression of peroxiredoxin 6 does not prevent ethanol-mediated oxidative stress and may play a role in hepatic lipid accumulation[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 330(1): 79-88.
- [4] Reuben A. Alcohol and the liver[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24(4): 328-338.
- [5] 丁晓东. 酒精性肝病肝损伤的信号通路[J]. *肝脏*, 2012, 17(4): 269-271.
- [6] Mulvihill EE, Huff MW. Antiatherogenic propertise of flavonoids; implications for cardiovascular health[J]. *Can J Cardiol*, 2010, 26(Suppl A): 17A-21A.
- [7] 孙海岚, 杨剑. 茶多酚的抗炎研究进展[J]. *重庆医学*, 2012, 41(35): 3766-3768.
- [8] 李萍, 杨志刚, 文国容, 等. 茶多酚对 ACC-M 细胞株 Fas、FasL 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2010, 39(3): 268-272.
- [9] Chen D, Milacic V, Chen MS, et al. Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets[J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(4): 487-496.
- [10] 唐元瑜, 水楠楠. 油红 O 染色原代未活化胰腺星状细胞脂肪滴的实验观察[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2013, 22(3): 266-268.
- [11] 丁伟, 陈晓超, 刘树滔, 等. 酒精对肝细胞损伤的自由基理研究[J]. *福州大学学报: 自然科学版*, 2009, 37(6): 924-928.
- [12] Xiu FW, Min Y. Relationship between alcohol consumption and clinical manifestation of patients with fatty liver: a single-center study[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2011, 10(3): 276-279.
- [13] 林春兰, 蒋建伟, 严玉霞, 等. 茶多酚对酒精诱导的小鼠肝脂质过氧化和血清 ALT 活性变化的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(1): 110-112.
- [14] Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body[J]. *Alcohol Res Health*, 2006, 29(3): 245-254.
- [15] Yu HS, Oyama T, Isse T, et al. Formation of acetaldehyde-derived DNA adducts due to alcohol exposure[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188(4): 367-375.
- [16] 李芬, 管小琴, 刘利. 茶多酚对酒精性肝病大鼠 TNF- α 及肝细胞的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(4): 356-360.
- [17] Nassir F, Ibdah JA. Role of mitochondria in alcoholic liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(9): 2136-2142.
- [18] Lau AT, Wang Y, Chiu JF, et al. Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(10): 657-667.

(收稿日期: 2014-02-13 修回日期: 2014-03-09)

(上接第 2735 页)

参考文献:

- [1] 蒋明, David YU, 林孝义, 等. 中华风湿病学[M]. 北京: 华夏出版社, 2004: 866-881.
- [2] 唐福林. 自身抗体检测的质控势在必行[J]. *中华风湿病学杂志*, 2004(8): 385-386.
- [3] 汪付兵, 涂建成. 自身免疫性疾病抗体谱及其实验室检测进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(7): 776-777.
- [4] Ilse E, A Hoffman. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative anti-nuclear antibody immunofluorescence screening tests[J]. *Clin Chem*, 2002, 48: 2171-2176.
- [5] Sack U, Conrad K, Csernok E. Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on Hep-2 cells[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2009(9): 166-173.
- [6] Maguire GA, Ginawi A, Lee J, et al. Clinical utility of ANA measured by ELISA compared with ANA measured by immunofluorescence[J]. *Rheumatol*, 2009, 48(10): 1013-1014.
- [7] 穆春晓. ANA 及抗 ENA 抗体联合检测对自身免疫病诊断价值分析[J]. *中国药业*, 2012(8): 171-172.
- [8] 吴庆. 抗可提取性核抗原抗体与抗核抗体的对照分析[J]. *国际检验医学杂志*, 2006, 27(8): 679-680.
- [9] 田巧. 间接免疫荧光法检测抗核抗体与免疫印迹法检测抗核抗体谱结果分析[J]. *中国社区医学*, 2013, 15(2): 217.
- [10] 王奔放, 郁建江, 周剑波, 等. 抗 SmD1 抗体在系统性红斑狼疮中的临床应用价值[J]. *临床和实验医学杂志*, 2012(3): 168-169.
- [11] 陈虹, 郑捷. RNP 抗原及其抗体[J]. *临床皮肤科杂志*, 2002, 31(6): 397-399.
- [12] Hengstman GJ, VreeEgberts WT, Seelig HP, et al. Clinical characteristics of patients with myositis and autoantibodies to different fragments of the Mi-2 beta antigen. [J] *Ann Rheum Dis*, 2006, 65(2): 242-245.
- [13] 李晓军. 抗核抗体检测的质量要求及结果的合理判读[J]. *临床检验杂志*, 2007, 25(2): 84-85.
- [14] 徐幼筠, 吴东海. 第二次全国自身抗体检测的质控总结[J]. *中华风湿病学杂志*. 2005, 9: 211-214.
- [15] 李永哲. 自身抗体检测技术临床推广应用和质量保证工作中应重视的问题[J]. *中华检验医学杂志*, 2006, 29(9): 769-773.
- [16] 王兰兰. 自身抗体检测的应用与质量保障原则[J]. *中华检验医学杂志*, 2005, 28(10): 17-20.
- [17] 万本愿, 李胜远, 姜青龙. 自身抗体检测的临床应用与质量控制[J]. *实验与检验医学*, 2013, 31(1): 52-54.

(收稿日期: 2014-02-02 修回日期: 2014-04-01)