

茶多酚对非酒精性脂肪肝细胞模型的实验研究

莫斯潋¹ 朱泳先¹ 韦庆国¹ 韦云舰¹ 陈永欣^{2*}

(1. 广西中医药大学瑞康临床医学院, 广西 南宁 530001;

2. 广西中医药大学基础医学院, 广西 南宁 530021)

【摘要】目的: 在细胞模型中研究茶多酚对非酒精脂肪肝的抑制作用机制。方法: 本研究采用油酸诱导肝细胞株 L02 建立脂肪变性细胞模型。将细胞分为 5 组: 对照组、模型组、茶多酚的低剂量组、茶多酚的中剂量组、茶多酚的高剂量组。然后使用油红 O 染色光镜观察细胞内脂滴的情况, 使用甘油三酯 (TG) 试剂盒测定细胞 TG 的含量, 以此鉴定细胞模型的成立。使用 CCK8 法检测茶多酚对脂肪肝细胞活力的影响, 试剂盒测定 TG、SOD、TNF- α 、IL-6 含量, Western Blot 法测定 PPAR α 通路相关蛋白。结果: 成功构建脂肪肝 LO2 细胞模型, 给药后, 各组均能降低 TG 的含量, 但 SOD、TNF- α 与 IL-6 的含量均未见明显变化, 且 WB 结果显示茶多酚对 PPAR α 通路没有影响, 实验结果为阴性。结论: 说明茶多酚对肝损伤具有保护作用。

【关键词】茶多酚; 非酒精性脂肪肝; PPAR α 通路

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的临床病理综合征, 是一种具有连续性的疾病, 并且随着肥胖及其相关代谢综合征全球化的流行趋势, 非酒精性脂肪性肝病现已成为我国富裕地区慢性肝病的重要病因, 普通成人 NAFLD 患病率 10% ~ 30%, 危害极大。而茶多酚 (TP) 是茶叶中多酚类物质的总称, 具有很高的生物活性, 具有降血压、抗凝血、降血脂肥胖、防治动脉硬化和血栓形成等心血管病、降血糖等功效。本项研究旨在讨论茶多酚对非酒精性脂肪肝 L02 细胞的影响和作用机制。

一、材料与仪器

(一) 药物与试剂

茶多酚购于陕西昂盛生物医药科技有限公司; 甘油三酯 (TG)、超氧化物歧化酶 (SOD)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6) 试剂盒均购于 Elabscience 公司。

(二) 主要仪器

全自动酶标仪 (Thermo Fisher 赛默飞公司)、培养箱 (Thermo Fisher 赛默飞公司)。

二、方法

(一) 细胞培养

细胞培养人肝细胞细胞株 L02 常规培养于含有

10% FCS 的 DMEM 的培养液中 (含 100U/ml 青霉素, 100ug/ml 链霉素), 放置于温度为 37℃、CO₂ 浓度为 5% 以及饱和湿度的环境中进行细胞培养, 隔天换液。根据细胞生长情况, 当细胞浓度达到 75-90% 后, 用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化, 再进行传代培养。

(二) 细胞分组、造模及给药

本研究将细胞分成 5 组: 正常对照组、模型组、茶多酚的低剂量组、茶多酚的中剂量组、茶多酚的高剂量组。

模型组采用油酸 (单不饱和脂肪酸) 诱导肝细胞株 L02 建立脂肪变性细胞模型, 然后用油红 O 染色光镜观察细胞内脂滴的情况, 使用甘油三酯试剂盒测定细胞 TG 的含量, 鉴定细胞模型成立。

正常对照组给予含有 10%FCS 的 DMEM 培养液, 茶多酚的低剂量组给予油酸+10%FCS 的 DMEM 培养液+茶多酚低剂量, 茶多酚的中剂量组给予油酸+10%FCS 的 DMEM 培养液+茶多酚中剂量, 茶多酚的高剂量组给予油酸+10%FCS 的 DMEM 培养液+茶多酚高剂量。

(三) CCK8 法测细胞存活率

将消化后制成单细胞悬浊液的 L02 脂肪肝细胞接种于 96 孔板中, 每组设置 5 个复孔, 每孔加入 10 μ l CCK-8 试剂, 37℃避光孵育 2 h, 最后用 CCK8 检测茶多酚对细胞增殖能力的影响。CCK8 细胞存活率计算公式如下: 存活率 (%) = (实验组 OD 值 -

空白对照组 OD 值)/(对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值)×100%。通过 CCK8 实验结果筛选出茶多酚最佳的作用浓度。

(四) 氧化应激及炎症反应相关指标检测

甘油三酯 (TG)、超氧化物歧化酶 (SOD)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6) 试剂盒测定细胞 TG、SOD、TNF- α 、IL-6 含量水平的变化。具体操作严格按照试剂盒说明书测定。

(五) Western Blot 检测 PPAR α 蛋白含量

Western Blot 实验原理是将蛋白质样品通过电泳分离后, 将分离的蛋白质转移到固相载体上, 然后利用抗体进行检测。抗体与特定的蛋白质目标结合, 形成抗原-抗体复合物, 再与酶或同位素标记的第二抗体结合, 经过底物显色或放射自显影来检测特异性目的基因表达的蛋白成分。通过这种方法, 可以检测出蛋白质样品中特定蛋白质的表达水平、分子量、等电点等信息。

三、结果

(一) 茶多酚抑制非酒精性脂肪肝细胞的增殖

实验结果显示模型组 TG 含量明显比正常组升高, 给药后, 均能降低 TG 的含量, 说明茶多酚对肝损伤具有保护作用。

(二) 茶多酚对非酒精性脂肪肝细胞氧化应激的影响

刘少峰^[1]等通过实验证实, TP (茶多酚) 可以显著使大鼠肝组织的过氧化产物 MDA (丙二醛) 显著降低, 并可以增加 SOD 的活性, 使大鼠肝脏的 GSH (谷胱甘肽) 的含量增高, 从而增强抗氧化能力。即 TP 可减轻脂质过氧化反应与血脂代谢对肝脏的损伤。但在本实验中, 茶多酚对非酒精性脂肪肝细胞氧化应激的影响未出现上述研究的结果。

(三) 茶多酚对非酒精性脂肪肝细胞炎症因子的影响

马涛^[2]等通过研究补充茶多酚对高脂膳食大鼠糖脂代谢及炎症因子 TNF- α 和 IL-6 的影响之实验, 发现补充茶多酚能抑制脂肪组织炎症因子 IL-6 表达和分泌。但在本实验中, 茶多酚对非酒精性脂肪肝炎症因子的影响未出现上述研究的结果。

(四) 茶多酚对非酒精性脂肪肝细胞 PPAR α 信号通路相关蛋白的影响

Wang Y^[3]等的研究表明, 激活 PPAR α 信号通路可以促进肝组织中 FFA 的 β 氧化以及调节脂质代谢,

从而提高脂质的有效利用效率, 减少肝脏中 FFA 合成和沉积。但本实验 WB 结果显示茶多酚对 PPAR α 信号通路没有影响, 实验结果为阴性。

四、讨论

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的肝细胞内脂肪过度沉积为主要特征的一种连续性的疾病, 与胰岛素抵抗和遗传易感性密切相关的获得性代谢应激性肝损伤, 非酒精性脂肪肝已经超越慢性病毒性肝炎成为我国第一大肝脏疾病。茶多酚 (Tea polyphenols, TP) 是茶叶中多酚类物质的总称, 是茶叶中最丰富的功能成分, 生物活性度较高, 对人体的脂质代谢有着重要的作用。在满子意^[4]等的研究中发现茶多酚可以抑制细胞脂肪酶的活性, 从而达到降低血脂的作用, 并抑制脂肪生成, 从而减轻肝损伤带来的危害。因此, 本研究探索茶多酚对治疗非酒精性脂肪肝的影响与抑制机制具有重要的意义。

鲁旭娟^[5]等的研究中, 提示 TG 是评估肝功能的重要指标, 而 TG 主要存在于组织细胞当中, 当肝细胞中的 TG 含量过高, 则会引起非酒精性脂肪肝, 而非酒精性脂肪肝患者因为脂肪代谢功能下降, 使得肝脏合成 TG 的速度大于脂蛋白释放入血的水平, 使得血清中的 TG 水平明显升高。在魏小勤^[6]的研究中, 将 30 例非酒精性脂肪肝患者设为 NAFLD 组, 将 31 例酒精性脂肪肝患者设为 AFLD 组进行对比, 并且另选择 30 例健康体检者设为对照组进行对照观察, 实验结果显示 NAFLD 组与 AFLD 组血脂中的 TG 含量明显高于对照组, 并且 NAFLD 组中 TG 的含量要高于 AFLD 组中的 TG 的含量, 研究认为非酒精性脂肪肝患者机体中的 TG 与 TC 的指标与正常的健康群体具有明显的差异, 且 TG 相较于 TC 有更高的诊断效能。以上两份研究均说明 TG 可以提示非酒精性脂肪肝病变的程度, 对评估对非酒精性脂肪肝的治疗效果具有重要意义。

杨恺清^[7]等的研究认为, 茶叶中的茶多酚具有高效的活性、极高的营养价值以及医疗药用的价值, 茶多酚通过直接作用于胃肠道的菌群生态结构, 特异的调节胃肠道菌群的稳态, 影响脂质代谢, 进而抑制脂蛋白酶的表达。汤荃荃^[8]等在研究黑茶桑叶固体饮料对高脂饮食小鼠的影响的实验显示, 经过茶多酚的干预, 小鼠肠道中与吸收更多热量而导致脂质积累的正相关菌门以及负相关菌门的相对丰度即均下降。

以上发现对使用茶多酚通过调节肠道微生物稳态治疗非酒精性脂肪肝具有重要的意义。在任兴远^[9]等的研究中显示余甘子与茶多酚配伍可以更有效地抑制SD大鼠的脂质代谢,降低SD大鼠体内器官的脂肪堆积,大鼠肝脏组织中的TG、TC水平低于模型组。在吴景涛^[10]等在对鸡屎藤与茶多酚干预大鼠结肠炎及脂肪肝的研究中,结果表明鸡屎藤联合茶多酚对非酒精性脂肪肝进行干预后可以影响脂质代谢,显著的下调大鼠体内的胆固醇含量,降低肝脏甘油三酯的水平,降低血清中内毒素的水平,从而减轻了肝脏的损伤。王丽丽^[11]等在对茶多酚对去卵巢大鼠肝脏脂质代谢的研究中,实验结果表明,茶多酚干预组的甘油三酯(TG)均呈下降趋势,病理检测显示茶多酚干预组的肝脏细胞内脂滴空泡样变得到了明显的改善,且随着干预剂量的增加,茶多酚对大鼠肝脏细胞内脂滴空泡样变改善的程度增强。该实验说明茶多酚(TP)可以降低肝脏的脂质水平。以上研究均说明茶多酚可以调节生物体内的脂质代谢,降低血脂,抑制甘油三酯(TG)在体内器官的堆积,减轻肝损害。本研究的实验结果显示,模型组的甘油三酯(TG)水平明显高于对照组,分别给予低、中、高浓度的茶多酚后,均能降低模型组与实验组的甘油三酯(TG)的含量,但WB法检测结果显示茶多酚对PPAR α 通路并无影响,提示茶多酚对肝损伤具有一定的保护作用。此研究为茶多酚用于治疗非酒精性脂肪肝提供一定的理论基础。

综上所述,茶多酚对机体内脂质代谢有调节作用,降低血脂,抑制甘油三酯在肝脏等器官的堆积,减轻肝损害,具有重要的药理价值。茶叶作为中国传统饮品,世界三大饮品之一,其中茶多酚作为茶叶精华所在,正在越来越被世界关注,越来越多的研究人员开始重视茶多酚在医疗保健方向上的研究,虽然目前对茶多酚药理作用的研究还未深入,大部分的研究集中在儿茶酚胺,对黄酮类等其它茶多酚缺少研究,但随着科学技术的发展,茶多酚的药用价值将会进一步得到开发。

参考文献:

- [1] 刘少锋,韩真,何池义.茶多酚对高脂饮食诱发大鼠非酒精性脂肪肝的防护作用以及对CYP2E1表达的影响[J].中西医结合肝病杂志,2005,15(4):4.
- [2] 马涛,王法涛,单小忠.有氧运动与补充茶

多酚对高脂膳食大鼠糖脂代谢及炎症因子TNF- α 和IL-6的影响[J].北京体育大学学报,2011.

[3] Wang Y, Nakajima T, Gonzalez FJ, et al. PPARs as metabolic regulators in the liver: lessons from liver-specific PPAR-Null mice. Int J Mol Sci, 2020, 21(6): 2061.

[4] 满子意,凤怡,吴祥庭.儿茶素单体EGC对胰脂肪酶的抑制作用及其机理研究[J].茶叶科学,2022,42(06):863-874.

[5] 鲁旭娟,张慧萍.非酒精性脂肪肝患者血脂、血糖和肝功能联合检测及其临床意义[J].贵州医药,2023,47(06):896-897.

[6] 魏小勤.血清甘油三酯及总胆固醇在非酒精性脂肪肝检测中的应用价值[J].临床研究,2022,30(09):111-114.

[7] 杨恺清,王凯博,陈思霖等.茶叶活性成分调节肠道菌群影响脂质代谢[J/OL].食品与发酵工业,1-8[2023-12-09]<https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.036883>.

[8] 汤荃荃,湛莉,张梓莹等.黑茶桑叶固体饮料对高脂饮食小鼠的减肥作用[J].中国酿造,2022,41(06):164-170.

[9] 任兴远,王文博,桂兰兰等.余甘子与茶多酚、左旋肉碱配伍对高脂饮食诱导大鼠肥胖的预防作用[J/OL].食品科学,1-16[2023-12-09]<http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20231020.1807.074.html>.

[10] 田景涛,吴强,罗杰等.鸡屎藤与茶多酚联合干预大鼠结肠炎及脂肪肝研究[J].黑龙江畜牧兽医,2018,(17):150-155.

[11] 王丽丽,宋晨萌,成乐等.茶多酚对去卵巢大鼠肝脏脂质代谢及JNK、Caspase-3蛋白表达的影响[J].现代预防医学,2022,49(23):4288-4293.

基金项目: 广西自然科学基金项目青年科学基金项目(2020GXNSFBA159043);广西中医药大学2019~2021年广西一流学科建设开放课题项目(2019XK083);2021年自治区级大学生创新创业训练计划项目(S202120600100)。

第一作者: 莫斯滢,本科在读。

通讯作者: 陈永欣,副教授,主要从事中医药防治肝病的基础研究。