

绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤的保护作用

吴伟青, 陈静*, 刘超群, 孔鹏, 严静, 程晖
(暨南大学医学院, 广东广州 510632)

摘要:目的: 研究绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤的保护作用。方法: 采取剂量递增法, 用56°北京红星二锅头白酒建立小鼠酒精性肝损伤模型, 用绿茶多酚进行干预, 实验10周后, 称小鼠体质量和肝质量指数, 测定肝脏谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量、肝脏谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、Na⁺-K⁺-ATP酶、血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性, 同时进行肝脏病理学检查。结果: 模型组小鼠体质量、肝脏GSH含量和肝脏SOD、GSH-Px及Na⁺-K⁺-ATP酶活性较对照组明显降低($P < 0.05$), 而肝质量指数、肝脏MDA含量、肝脏XOD酶及血清ALT和AST活性均明显增高($P < 0.05$); 肝脏呈现明显脂肪变性和炎症病理学改变。与模型组比较, 绿茶多酚各剂量组小鼠肝质量指数下降($P < 0.05$); 肝脏SOD和GSH-Px酶活性增高($P < 0.05$); 高、中剂量组小鼠体质量增加, 血清AST、ALT酶和肝脏XOD酶活性降低($P < 0.05$), 肝脏Na⁺-K⁺-ATP酶活性升高($P < 0.05$); 高剂量组MDA含量明显降低, GSH含量增加($P < 0.05$); 肝脏病理学改变减轻或逆转。结论: 绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤有明显保护作用, 机理与其抗氧化作用有关。

关键词: 绿茶多酚; 酒精性肝损伤; 抗氧化

Protective Effect of Green Tea Polyphenols against Chronic Alcoholic Hepatic Injury in Mice

WU Wei-qing, CHEN Jing*, LIU Chao-qun, KONG Peng, YAN Jing, CHENG Hui
(School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: Purpose: To explore the protective effect of green tea polyphenols on chronic alcoholic hepatic injury in mice. Methods: Liver injury was induced in mice by 56° Beijing Red Star Erguotou wine at gradually increasing dose. The mouse model with liver injury was intervened by green tea polyphenols for 10 weeks followed by determination of body weight and liver index. Meanwhile, the contents of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), xanthine oxidase (XOD) and Na⁺-K⁺-ATPase in the liver, and serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels were also determined. Hepatic pathological changes were examined. Results: The model group displayed a significant reduction in body weight, hepatic GSH content and hepatic SOD, GSH-Px and Na⁺-K⁺-ATPase activities when compared with the control group ($P < 0.05$), while a significant increase in liver index, hepatic MDA content, hepatic XOD activity and serum ALT and AST activities was observed for the model group ($P < 0.05$), and the fat degeneration in liver and pathological inflammation revealed an obvious change. Compared with the model group, green tea polyphenol-treated rats indicated a decrease in liver index ($P < 0.05$), an increase in hepatic SOD and GSH-Px activities, the high- and medium-dose groups revealed higher body weight and hepatic Na⁺-K⁺-ATPase activity and lower serum ALT and AST activities and hepatic XOD activity ($P < 0.05$), a significant decrease in hepatic MDA content and an increase in hepatic GSH content were observed for the high-dose group. Furthermore, hepatic pathological changes were attenuated or even reversed. Conclusion: Green tea polyphenols can protect liver from chronic alcoholic damage to some extent, and the mechanism may be related to its antioxidant effect.

Key words: green tea polyphenols; alcoholic hepatic injury; antioxidation

中图分类号: TS272.5

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)13-0310-04

酒精性肝病是慢性酒精中毒最常见和最严重的并发症之一。近年随着我国酒精消费量的不断增长, 群体酒精性肝病发病率逐年升高, 已经成为继病毒性肝炎之

后的第二大肝病, 由于临床尚无特效药物治疗, 其损伤又呈不可逆性^[1-2]。所以研究探讨预防和早期遏制酒精性肝损伤的有效方法显得尤为重要。依据酒精性肝病早

收稿日期: 2010-11-03

作者简介: 吴伟青(1983—), 男, 硕士研究生, 研究方向为膳食营养与慢性病。E-mail: benwwq@163.com

* 通信作者: 陈静(1960—), 女, 教授, 硕士, 研究方向为膳食营养与慢性病。E-mail: tliujus@jnu.edu.cn

期脂肪变性及炎症细胞浸润等病理损伤与酒精代谢产生的大量自由基密切相关的机理^[3-4], 临床上采用传统抗氧化剂 VA 和 VE 治疗酒精性肝病, 但疗效不佳, 天然植物抗氧化活性成分是否能够有效拮抗酒精性肝损伤是目前食品和医学研究领域共同关注的热点^[5-12]。

绿茶多酚(polyphenols, GTP)是从绿茶中提取的天然有效成分, 研究证实, 其具有抗菌、抗突变、抗衰老、抗癌等多种药理作用^[13-14], 特别是抗氧化作用尤为突出。本研究旨在从抗氧化角度研究探讨绿茶多酚对小鼠酒精性肝脏损伤的保护作用, 为寻找预防和早期治疗酒精性肝病的有效方法提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料、试剂与仪器

北京红星二锅头白酒 广州市好又多超市。绿茶多酚: 纯度 98%, 美国原材料, 由广州新海得实业有限公司同格保健食品厂提供。

丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、Na⁺-K⁺-ATP 酶、谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)试剂盒 南京建成生物工程研究所。

TGL-16G 低温高速离心机 上海安亭科学仪器厂; 9606 酶标分析仪 普朗医疗设备有限公司。

1.2 实验动物

SPF 级健康 KM 小鼠 50 只, 雌雄各半, 体质量 20~22 g, 由广东医学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(粤)2008-0002。动物饲养条件: 温度 22~25℃, 湿度 75%。

1.3 动物分组及处理

健康 KM 小鼠适应性喂养 10d 后, 按体质量随机分为对照组、模型组及绿茶多酚高剂量组(200mg/kg)、中剂量组(150mg/kg)和低剂量组(100mg/kg)5 组, 每组 10 只。对照组用蒸馏水灌胃, 其余各组以剂量递增法, 用 56° 北京红星二锅头白酒 0.05mL/(10g·d)灌胃 3d 后, 改为 0.08mL/(10g·d)剂量灌胃 5d, 之后改为 0.10mL/(10g·d)剂量灌胃 1 周, 最后增至 0.12mL/(10g·d)剂量灌胃至实验结束前 1d, 用 0.15mL/(10g·d) 剂量冲击性灌胃。每天用白酒灌胃 30min 前, 对照组和模型组灌胃蒸馏水, 其他实验组灌胃不同剂量绿茶多酚, 连续实验 10 周。

1.4 测定指标及方法

实验 10 周末, 给小鼠灌胃后禁食 12h, 称质量, 拔眼球取血, 颈椎脱臼处死小鼠后迅速取出肝脏称质量, 一部分用 10% 福尔马林固定留做病理学检测, 其余用冷生理盐水制成 10% 肝匀浆, 按试剂盒说明进行指标测定, 取血清进行 ALT 及 AST 活性测定。

1.5 数据的统计处理

采用 SPSS13.0 软件包进行处理, 实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 绿茶多酚对慢性酒精中毒小鼠体质量和肝质量指数的影响

表 1 各实验组小鼠肝质量指数和体质量的比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 1 Comparisons of liver indices and body weights of mice from each experimental group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	终体质量/g	肝质量指数/%
对照组	43.25 ± 3.01	4.81 ± 0.65
模型组	30.82 ± 6.30 ^a	6.00 ± 0.90 ^a
绿茶多酚高剂量组	35.49 ± 2.95 ^b	5.25 ± 0.65 ^b
绿茶多酚中剂量组	35.81 ± 4.49 ^b	5.35 ± 0.43 ^b
绿茶多酚低剂量组	31.32 ± 5.88 ^a	5.12 ± 0.68 ^b

注: a. 与对照组相比有显著性差异, $P < 0.05$; b. 与模型组相比有显著性差异, $P < 0.05$ 。下同。

表 1 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠体质量明显减轻($P < 0.05$), 表明长期大量饮酒会影响小鼠食欲及对食物的吸收能力, 肝质量指数增加($P < 0.05$), 提示肝脏组织存在受损肿胀情况。与模型组比较, 绿茶多酚各剂量组肝质量指数明显降低($P < 0.05$), 体质量增加, 以高、中剂量组效果显著($P < 0.05$), 表明绿茶多酚具有改善慢性酒精中毒小鼠食欲和吸收功能作用, 并对其肝脏损伤有一定保护作用。

2.2 绿茶多酚对慢性酒精中毒小鼠血清 ALT 和 AST 酶活性的影响

表 2 各实验组小鼠血清 AST 和 ALT 活性的比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
Table 2 Comparisons of serum AST and ALT activities in mice from each experimental group ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	ALT 活力/(U/L)	AST 活力/(U/L)
对照组	16.47 ± 6.1	66.02 ± 13
模型组	31.21 ± 8.5 ^a	114.45 ± 19 ^a
绿茶多酚高剂量组	17.62 ± 6.8 ^b	88.06 ± 10 ^b
绿茶多酚中剂量组	16.92 ± 8.1 ^b	81.15 ± 9 ^b
绿茶多酚低剂量组	23.73 ± 11.0	130.75 ± 11 ^a

表 2 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清 ALT 和 AST 活性明显增高($P < 0.05$), 表明长期饮酒已对小鼠肝脏造成严重损伤, 慢性酒精中毒小鼠肝损伤模型建立成功。与模型组比较, 绿茶多酚高、中剂量组小鼠 ALT 和 AST 活性明显降低($P < 0.05$), 低剂量组差异无统计学意义($P > 0.05$), 表明绿茶多酚对慢性酒精中

毒小鼠肝细胞损伤具有一定的保护作用。

2.3 绿茶多酚对慢性酒精中毒小鼠肝脏 XOD 和 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响

表 3 各实验组小鼠肝脏 XOD 和 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的比较($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 3 Comparisons of live XOD and Na⁺-K⁺-ATPase activities in mice from each experimental group ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	XOD活力/(U/mg pro)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP活力/(μ mol Pi/(mg pro·h))
对照组	33.77 ± 16	14.18 ± 2.5
模型组	78.05 ± 37 ^a	6.08 ± 1.4 ^a
绿茶多酚高剂量组	59.78 ± 17 ^{ab}	12.13 ± 4.0 ^b
绿茶多酚中剂量组	45.24 ± 27 ^b	7.97 ± 2.8 ^{ab}
绿茶多酚低剂量组	55.01 ± 27 ^{ab}	7.13 ± 1.8 ^a

表 3 结果显示, 模型组小鼠肝脏氧化酶 XOD 活性较对照组明显增高($P < 0.05$), 而肝组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性明显降低($P < 0.05$), 表明过量酒精染毒可导致小鼠肝脏氧化应激增强, 自由基生成增多, 肝细胞膜受损。与模型组比较, 绿茶多酚高、中剂量组 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性有所增高($P < 0.05$), 各组 XOD 活性均有降低, 以中剂量组差异显著($P < 0.05$), 表明绿茶多酚可通过清除自由基, 而干预酒精对小鼠肝细胞膜的损伤。

2.4 绿茶多酚对慢性酒精中毒小鼠肝脏 SOD、GSH-Px 活性及 GSH 和 MDA 含量的影响

表 4 各实验组小鼠 SOD 活性和 GSH-Px 活性的比较($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 4 Comparisons of SOD and GSH-Px activities in mice from each experimental group ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	SOD活力/(U/mg pro)	GSH-Px活力/(U/mg pro)
对照组	76.55 ± 11	348.64 ± 66
模型组	14.78 ± 5 ^a	113.99 ± 27 ^a
绿茶多酚高剂量组	65.61 ± 10 ^b	311.52 ± 72 ^b
绿茶多酚中剂量组	66.73 ± 9 ^b	244.19 ± 87 ^{ab}
绿茶多酚低剂量组	51.70 ± 9 ^{ab}	227.33 ± 69 ^{ab}

表 5 各实验组小鼠肝 MDA 和 GSH 含量的比较($\bar{x} \pm s$, n=10)

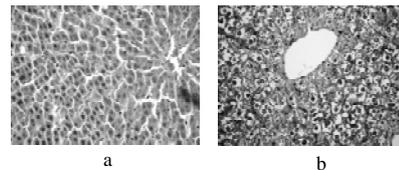
Table 5 Comparisons of liver MDA and GSH contents in mice from each experimental group ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	MDA含量/(nmol/mg pro)	GSH含量/(mg GSH/g pro)
对照组	11.00 ± 2.1	25.71 ± 8.4
模型组	19.18 ± 6.8 ^a	13.52 ± 5.1 ^a
绿茶多酚高剂量组	12.56 ± 3.4 ^b	23.33 ± 7.5 ^b
绿茶多酚中剂量组	15.7 ± 3.6	18.30 ± 7.2
绿茶多酚低剂量组	17.62 ± 5.2 ^a	15.47 ± 4.1 ^a

表 4、5 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏 MDA 含量明显增高, GSH 含量明显减少($P < 0.05$), SOD 和 GSH-Px 活性明显降低($P < 0.05$), 表明慢性酒精

中毒小鼠肝脏内氧化和抗氧化平衡失调。与模型组比较, 绿茶多酚高剂量组 MDA 含量明显减低, GSH 含量则明显增加($P < 0.05$), 但中、低剂量组 MDA 含量降低及 GSH 含量增加均不显著($P > 0.05$); 各剂量组 SOD 和 GSH-Px 活性明显增强($P > 0.05$), 呈现正剂量效应关系。提示绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤的保护作用与其提高机体抗氧化能力有关。

2.5 绿茶多酚对慢性酒精中毒小鼠肝组织形态的影响



a. 对照组; b. 模型组; c. 绿茶多酚高剂量组; d. 绿茶多酚中剂量组; e. 绿茶多酚低剂量组。

图 1 各实验组小鼠肝组织形态的比较(HE × 400)

Fig.1 Comparisons of liver histology in mice from each experimental group (HE × 400)

图 1 光镜观察结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝细胞明显肿胀, 肝小叶界限模糊, 肝细胞小泡性脂肪变性, 细胞核被挤压至一侧, 汇管区有炎细胞浸润, 肝小叶内坏死灶明显增多, 证实小鼠酒精性肝损伤模型建立成功, 提示持续 10 周酒精灌胃造成的小鼠肝损伤主要以脂肪和炎症性病理学改变为主。与模型组比较, 绿茶多酚各剂量组肝细胞肿胀减轻, 脂肪变性和炎症性病变改善。以高剂量组效果最好, 肝小叶界限清晰可变, 中剂量组介于高低剂量组之间, 表明绿茶多酚具有逆转肝细胞脂肪变性、减轻炎症和修复肝细胞的作用。

3 讨论

本研究模拟人类慢性酒精中毒肝脏损伤过程, 采用剂量递增和最后冲击的饮酒方法给小鼠每天灌胃高度白酒, 随着酒精灌胃剂量的增加和时间的延长, 发现模型组小鼠皮毛光泽度变差, 第 4 周后体质量开始下降, 10 周末终体质量明显低于对照组, 表明长期过量饮酒导致的小鼠食欲和吸收功能降低, 易造成小鼠营养不良。

ALT 和 AST 是存在肝细胞浆和线粒体中的转氨酶, 当肝细胞严重病变、坏死时, ALT 和 AST 就会渗漏入血, 所以血清 ALT 和 AST 活性升高为肝细胞损伤的特异性指标, 而肝脏病理学检查则被认为是判断肝脏损伤

的金标准。本研究模型组小鼠血清 ALT 和 AST 水平明显升高, 肝脏出现明显的脂肪和炎症性病理学改变的结果, 证实小鼠酒精性肝脏损伤模型建立成功。与对照组比较, 模型组小鼠肝质量指数明显增加, 也提示和间接进一步证实慢性酒精中毒小鼠肝细胞存在脂肪变性、炎细胞浸润和肿胀等病理学改变。

从氧化应激和抗氧化指标分析, 本研究模型组小鼠肝脏抗氧化物质 GSH 含量减少, 抗氧化酶 SOD、GSH-Px 和肝细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性下降, 氧化应激酶 XOD 活性提高, 脂质过氧化终产物 MDA 含量增加, 与酒精性肝损伤机理研究结果相符, 证实酒精代谢导致的小鼠体内氧化和抗氧化的平衡失调是肝脏损伤的主要原因。

国外研究证实, 绿茶多酚因其结构中含有多酚类羟基, 极易被氧化成醌类而提供质子 H, 所以具有很强的抗氧化作用^[15-16]。本研究造模同时用绿茶多酚干预 10 周后结果显示, 小鼠体质量较模型组增加, 肝质量指数降低并接近正常组, 血清 ALT 和 AST 水平下降, 肝细胞脂肪空泡减少, 肿胀和炎症病变改善; 肝细胞 MDA 含量和 XOD 活性降低、GSH 含量增加, SOD、GSH-Px 和 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶活性升高。表明绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤具有保护作用, 对小鼠酒精性肝损伤早期出现的脂肪变性和炎症病理学改变具有一定逆转和抑制其发展的作用, 其作用机理与绿茶多酚清除自由基、防止其爆发性增加, 抑制脂质过氧化作用、减少肝细胞膜氧化损伤从而稳定细胞膜 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶功能有关。

上述研究结果证实, 绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤干预有效, 有进一步研究开发的價值, 但因本研究绿茶多酚不同剂量对各效应指标的影响尚未呈现一致性的剂量效应关系, 低剂量效果不佳。所以有关绿茶多酚对小鼠酒精性肝损伤干预的最佳有效剂量和确切机理还有需一步的研究。

参考文献:

- [1] MANDAYAM S, JAMAL M M, MORGAN T R. Epidemiology of alcoholic liver disease[J]. *Seminars in Liver Disease*, 2004, 24(3): 2179-232.
- [2] 鲁晓岚, 陶明, 罗金燕, 等. 饮酒与肝病流行病学调查[J]. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10(6): 467-468.
- [3] SUBIR K D, VASUDEVAN D M. Alcohol -induced oxidative stress[J]. *Life sciences*, 2007, 81(2): 177-187.
- [4] LOGUERCIO C, FEDERICO A. Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(1): 1-8.
- [5] 仓怀芹, 高华, 刘坤, 等. 硫酸软骨素对慢性酒精中毒大鼠脑损伤的保护作用[J]. *现代生物医学进展*, 2009, 19(19): 3655-3657.
- [6] 张国升, 凡明月, 彭代银, 等. 芦根多糖保肝作用的研究[J]. *中国药学报*, 2002, 17(7): 416-417.
- [7] 宋印利, 高普军. 五杞粗多糖保肝作用的药理作用分析[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2002, 23(3): 245.
- [8] 李舒丹, 厉有名, 虞朝晖. 大鼠慢性酒精肝损伤模型的建立[J]. *浙江医学*, 2002, 24(9): 524-525.
- [9] 杨牧祥, 于文涛, 胡金宽, 等. 酒速愈对急性酒精中毒小鼠解酒作用及酒精代谢的影响[J]. *世界健康文摘*, 2007, 4(3): 37-39.
- [10] 田德禄, 丁霞. 酒精性肝病的发病机制与诊断[J]. *中国中西医结合脾胃杂志*, 1999, 7(1): 1-3.
- [11] 张国升, 凡明月, 彭代银, 等. 芦根多糖对四氯化碳小鼠肝损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(3): 354-355.
- [12] 黄永平, 周世文, 徐颖, 等. 乙酰半胱氨酸对小鼠酒精中毒的影响[J]. *中国药房*, 2004, 15(7): 403-404.
- [13] WU L Y, JUAN C C, HWANG L S, et al. Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model[J]. *Eur J Nutr*, 2004, 43(2): 116-120.
- [14] SIRIPATRAWAN U, HARTE B R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract [J]. *Food Hydrocolloids*, 2010, 24(8): 770-775 .
- [15] LAMBERT J D, ELIAS R J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: a role in cancer prevention[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2010, 501(1): 65-72.
- [16] MIYATA M, SATO T, KUGIMIYA M, et al. the crystal structure of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate-transthyretin complex reveals a novel binding site distinct from the thyroxine binding site[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(29): 6104-6114.