

茶多酚和维生素 C 对人胚肾 293 细胞缺糖缺氧损伤保护作用的比较

吕 勇¹, 金 越¹, 韩国柱^{1*}, 周 琴¹, 孙慧君¹, 李 楠²

(1. 大连医科大学 药理教研室, 辽宁 大连 116027; 2. 大连理工大学 化学分析教研室, 辽宁 大连 116023)

摘 要:目的 从细胞水平研究茶多酚(TP)对人胚肾 293 细胞缺糖缺氧性损伤的保护作用,并与抗氧化剂维生素 C(VC)进行比较。方法 采用缺糖培养基并以连二亚硫酸钠消除培养基中的氧,诱导产生缺氧缺糖损伤模型,测定细胞的存活率、乳酸脱氢酶(LDH)和超氧化物歧化酶(SOD)活性以及总抗氧化能力,并计算 IC₅₀。结果 在细胞损伤模型中,TP 和 VC 均表现出极强的抗氧化能力,TP 能显著提高细胞的存活率、SOD 活性和总抗氧化能力并抑制 LDH 的活性,TP 的作用均大于 VC。结论 TP 和 VC 体外具有强大的自由基清除作用,且呈现明显的剂量依赖性,TP 在细胞损伤模型中的抗自由基作用均大于 VC。

关键词:茶多酚(TP); 维生素 C(VC); 自由基; 缺氧缺糖性损伤; 人胚肾 293 细胞

中图分类号:R286.75 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2007)09-1370-03

Comparative study on protective effects of tea polyphenols and vitamin C on anoxia/hypoglycemia injury in cultured human embryonic renal cell 293

LÜ Yong¹, JIN Yue¹, HAN Guo-zhu¹, ZHOU Qin¹, SUN Hui-jun¹, LI Nan²

(1. Department of Pharmacology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2. Department of Analytical Chemistry, Dalian University of Sciences and Technology, Dalian 116023, China)

Key words: tea polyphenol (TP), vitamin C (VC); free radical; anoxia/hypoglycemia injury; human embryonic renal cell 293

茶多酚(tea polyphenol, TP)是从绿茶中提得的一种多酚类化合物的总称,是茶叶的主要活性成分^[1]。目前,国内外学者对 TP 的大量研究表明,TP 具有抗氧化、抗肿瘤、抗衰老等生物活性^[2~4]。但 TP 对离体人胚肾细胞损伤的保护作用国内外鲜有报道。本研究旨在研究 TP 对缺糖缺氧诱导的人胚肾 293 细胞损伤的保护作用,并与维生素 C(VC)进行比较,从而为 TP 的新药开发进一步提供证据。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂:TP,购自江西婺源茶场,质量分数≥98%;VC 分析纯;连二亚硫酸钠,中国医药公司北京公司;DMEM 培养基 Hyclone 公司;胎牛血清,杭州四季青生物制品研究所;噻唑蓝(MTT),Genetimes Technology Inc 公司;SOD、LDH、总抗氧化能力试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。

1.2 仪器:3366 型二氧化碳培养箱,美国 Forma Scientific;XD-101 倒置显微镜,南京江南光电(集团)股份有限公司;Thermo-354 酶标仪,美国热电公司;SW-CJ-IFD 超净工作台,苏净集团安

泰公司;80-1 型离心机,上海手术器械厂。

1.3 细胞株:人胚肾 293 细胞株,由大连医科大学附属第二医院分子生物学实验室惠赠。

1.4 人胚肾 293 细胞的缺氧缺糖损伤模型的复制及实验分组:根据文献方法^[5,6]稍加改进建立缺氧缺糖模型。将正常 DMEM 培养液培养的 293 细胞用含糖 Earle's 液(g/L)(NaCl 6.68, KCl 0.4, CaCl₂ 0.2, MgSO₄ · 7H₂O 0.2, NaHCO₃ 2.2, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.4, HEPES 2.4, 葡萄糖 0.2, pH 7.4),洗细胞 2 次,并稀释至 1×10⁵/mL,接种于 96 孔培养板上,作为正常组。细胞用含 0.45 mmol/L 连二亚硫酸钠的无糖的 Earle's 液以同样方法洗涤并稀释至 1×10⁵/mL,接种在同一块 96 孔培养板上,作为损伤组。另取损伤组细胞加以不同浓度的药物作为给药组。将培养板置于 5% CO₂、37℃ 培养箱中培养 24 h 后观察并测定指标。损伤组及给药组统称实验组。

1.5 指标的检测

1.5.1 细胞存活率:采用 MTT 法^[7],将培养 24 h

收稿日期:2006-12-13

基金项目:大连市科技计划项目(2002B4NS044)

作者简介:吕 勇(1979—),男,河南新乡市人,硕士研究生,主要从事茶多酚和黄酮类化合物的抗自由基作用研究。

* 通讯作者 韩国柱 Tel: (0411) 84720229 E-mail: hgzhx2236@sina.com

后的 96 孔细胞培养板每孔加入 10 μL MTT (5 mg/mL), 4 h 后镜下观察结晶情况并每孔加入 100 μL 三联液 (含 10% SDS, 5% 异丁醇, 0.012 mmol/L HCl), 将细胞培养板放回培养箱, 12 h 后取出, 在酶标仪上测定吸光度 (A) 值, 检测波长 560 nm, 参比波长为 630 nm。计算细胞存活率^[8]。

细胞存活率 = $(A_{\text{实验组}}/A_{\text{正常组}}) \times 100\%$

1.5.2 LDH、SOD 和总抗氧化能力的测定: 按照试剂盒说明进行, 取细胞培养上清液测定 LDH 活力, 用 1% 的 Triton-100 裂解细胞后取培养液测定 SOD 及总抗氧化能力。采用考马斯亮蓝法测定蛋白, 黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力, 酶偶联比色法测定 LDH 活力, Fenton 反应比色法测定总抗氧化能力。

1.5.3 抑制率及 IC_{50} 的计算: $[\text{抑制率} = (A_{\text{给药组}} - A_{\text{损伤组}}/A_{\text{正常组}} - A_{\text{损伤组}}) \times 100\%]$ 。将抑制率对药物浓度的对数作图求其线性方程, 根据该线性方程求其 IC_{50} , 用于 TP 和 VC 的抗自由基活性强度的比较。

1.6 统计方法: 全部实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 软件包作方差分析, 组间作 t 检验。

2 结果

2.1 TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤后细胞存活率的影响: 由表 1 可知, TP 和 VC 能显著提高细胞的存活率 (Y), 且与浓度 (X) 呈明显量效关系。其中 TP 线性方程为: $Y = 0.6477X + 0.9974$ ($r = 0.9916$); VC 线性方程为: $Y = 0.5589X + 0.8738$ ($r = 0.991$)。TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤所致细胞存活率下降的 IC_{50} 分别为 0.17 mmol/L 和 0.21 mmol/L, 两药的作用强度 $\text{TP} > \text{VC}$ 。

表 1 TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤后细胞存活率的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of TP and VC on cell survival percentage after anoxia/hypoglycemia injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mmol · L ⁻¹)	A 值	细胞存活率/%	抑制率/%
正常	—	0.249 ± 0.017	100.00	—
损伤	—	0.037 ± 0.006 $\Delta\Delta$	14.75 ± 2.35	—
TP	0.37	0.187 ± 0.039**	75.34 ± 5.74	71.07
	0.19	0.158 ± 0.019**	63.54 ± 2.09	55.66
	0.09	0.101 ± 0.022**	40.48 ± 7.92	28.62
	0.05	0.072 ± 0.011*	28.95 ± 5.75	15.09
	0.02	0.045 ± 0.008*	18.55 ± 3.19	8.55
VC	0.45	0.190 ± 0.070**	76.41 ± 2.58	70.75
	0.23	0.140 ± 0.055**	56.30 ± 2.03	47.17
	0.11	0.115 ± 0.054**	46.38 ± 9.75	35.53
	0.06	0.079 ± 0.008**	31.90 ± 1.19	18.55

与正常组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

与损伤组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs injury group

2.2 TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤后细胞 SOD 活力的影响: 由表 2 可知, TP 和 VC 能显著提高 SOD 活力 (Y), 且与浓度 (X) 呈明显量效关系。其中 TP 线性方程为: $Y = 0.5449X + 1.1826$ ($r = 0.9896$); VC 线性方程为: $Y = 0.5494X + 1.0467$ ($r = 0.9969$)。TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤后 SOD 活力下降的 IC_{50} 分别为 0.06 mmol/L 和 0.10 mmol/L, 两药的作用强度 $\text{TP} > \text{VC}$ 。

表 2 TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤后细胞 SOD 活力的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of TP and VC on cell SOD activity after anoxia/hypoglycemia injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mmol · L ⁻¹)	SOD 活力/(U · mL ⁻¹)	抑制率/%
正常	—	16.78 ± 0.92	—
损伤	—	12.31 ± 0.90 $\Delta\Delta$	—
TP	0.19	15.88 ± 0.31**	75.57
	0.09	15.54 ± 0.56**	66.28
	0.05	14.78 ± 0.54**	45.47
	0.02	14.13 ± 0.53**	27.83
	0.01	13.88 ± 0.41**	17.22
VC	0.23	15.68 ± 0.65**	70.13
	0.11	15.04 ± 0.82**	52.71
	0.06	14.35 ± 0.79**	33.94
	0.03	13.88 ± 0.41**	21.27

与正常组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与损伤组比较: ** $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group; ** $P < 0.01$ vs injury group

2.3 TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤后细胞总抗氧化能力的影响: 由表 3 可知, TP 和 VC 能显著提高总抗氧化能力 (Y), 且与浓度 (X) 呈明显量效关系。其中 TP 线性方程为: $Y = 0.7433X + 1.3592$ ($r = 0.9934$); VC 线性方程为: $Y = 0.6875X + 0.9445$ ($r = 0.9909$)。TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤后细胞总抗氧化能力下降的 IC_{50} 分别为 0.07 mmol/L 和 0.10 mmol/L, 两药的作用强度 $\text{TP} > \text{VC}$ 。

表 3 TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤后细胞总抗氧化能力的影响
($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effect of TP and VC on cell antioxidant capacity after anoxia/hypoglycemia injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mmol · L ⁻¹)	总抗氧化能力/(U · mL ⁻¹)	抑制率/%
正常	—	21.05 ± 0.40	—
损伤	—	2.29 ± 0.08 $\Delta\Delta$	—
TP	0.19	18.11 ± 0.17**	84.32
	0.09	12.48 ± 0.28**	54.35
	0.05	9.43 ± 0.15**	38.06
	0.02	5.13 ± 0.12*	15.17
	0.01	4.87 ± 0.11*	12.19
VC	0.45	16.10 ± 0.25**	73.63
	0.23	11.32 ± 0.41**	48.13
	0.11	7.07 ± 0.13**	25.49
	0.06	4.57 ± 0.13**	12.19

与正常组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

与损伤组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs injury group

0.19 mmol/L, 两药的作用强度 TP>VC。

2.4 TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤后上清液中 LDH 活力的影响: 由表 4 可知, TP 和 VC 能显著抑制 LDH 活力 (Y), 且与浓度 (X) 呈明显量效关系。其中 TP 线性方程为: $Y = 0.6084X + 0.803$ ($r = 0.9938$); VC 线性方程为: $Y = 0.651X + 0.6314$ ($r = 0.9868$)。TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤所致 LDH 升高的 IC₅₀ 分别为 0.32 mmol/L 和 0.63 mmol/L, 两药的作用强度 TP>VC。

表 4 TP 和 VC 对缺氧缺糖损伤后细胞上清液中 LDH 活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of TP and VC on LDH vitality in supernatant after anoxia/hypoglycemia injury ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mmol·L ⁻¹)	LDH 活力/(U·L ⁻¹)	抑制率/%
正常	—	1075.96±127.99	—
损伤	—	2609.33±140.47 ^{△△}	—
TP	0.74	1472.15±98.76 ^{**}	74.16
	0.37	1835.96±217.19 ^{**}	50.44
	0.19	2028.78±74.42 ^{**}	37.86
	0.09	2344.04±268.19 ^{**}	17.30
VC	1.82	1327.89±183.09 ^{**}	83.57
	0.91	1760.67±365.15 ^{**}	55.34
	0.45	1989.37±213.72 ^{**}	40.43
	0.23	2253.26±164.04 ^{**}	23.22

与正常组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$

与损伤组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs injury group

3 讨论

TP 具有两个以上的酚性羟基, 能提供氢, 具有抗氧化作用。许多研究表明, TP 能够清除 O₂⁻、·OH 及脂自由基等, 且具有量效关系^[9]。本实验采用了人胚肾 293 细胞缺糖缺氧损伤模型研究了 TP 和 VC 的抗氧化作用, 结果证实了缺糖缺氧可导致细胞膜损伤, 使膜通透性增高, 细胞内 LDH 漏出, 细胞培养液上清中 LDH 活性显著升高。同时本实验 MTT 比色法的结果显示 TP 和 VC 能不同程度地降低细胞缺糖缺氧所致的膜损伤, 减少胞浆酶 LDH 的漏出, 有较好的剂量效应关系, 由此提示 TP 和 VC 具有抗氧化、保护细胞膜减轻自由基损伤的作用。缺糖缺氧损伤可以使细胞 SOD 活力和总抗氧化能力下降, 加入 TP 后, 可明显提高由于缺糖缺氧作用而下降的 SOD 活力和总抗氧化能力,

且与胞浆标志酶 LDH 的释放减少相一致, 有剂量效应关系。实验结果说明 TP 和 VC 具有拮抗缺糖缺氧细胞损伤的作用, 提高细胞的存活率, 这可能与它们抗氧化功能有关。

本实验采用了计算 IC₅₀ 的方法进行 TP 与 VC 抗自由基强度的比较, 结果显示 TP 强于 VC。这可能与 TP 分子中含有多羟基酚结构、苯并吡喃环和苯酚环之间的大 π 键有关, 从而显示较强的抗氧化作用, TP 也可能通过其他作用机制起间接的作用, 而不是直接清除自由基^[10]。

查阅国内外文献, 虽已有大量文献证实了 TP 的抗自由基作用, 但是某些实验报告在比较 TP 与 VC 强度时, 只采用一或两个浓度所产生的作用进行比较, 而不是采用产生某一特定作用所需的浓度 (剂量) 进行比较, 这并不能确切地判断药物之间的强弱关系。在本实验体系中采取了测定 IC₅₀ 的方法, 从而作出了较为客观和可靠的比较。

References:

- [1] Yang C S, Chung J Y, Yang G, et al. Tea and tea polyphenols in cancer prevention [J]. *J Nutr*, 2000, 130: 472.
- [2] Zhao B L, Liu S L, Chen Y S, et al. Scavenging effect of catechin on free radicals studied by molecular orbital calculation [J]. *Acta Pharmacol Sin* (中国药理学报), 1992, 13: 9-13.
- [3] Yang C S. Inhibition of carcinogenesis by tea [J]. *Nature*, 1997, 389: 134-135.
- [4] Sartippour M R, Shao Z M, Heber D, et al. Green tea inhibits vascular endothelial growth factor (VEGF) induced in human breast cancer cells [J]. *J Nutr*, 2002, 132: 2307-2311.
- [5] Salvaterra C G, Goldman W F. Direct effect of hypoxia on apparent intracellular calcium levels in cultured pulmonary vascular smooth muscle cells [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1991, 143: A373.
- [6] Zheng J J, Chen Q, Hu D M, et al. Influence of ODQ for the synthesis of guanosine cyclic monophosphate and glial-fibrillary acidic protein in hippocampus after cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理学杂志), 2001, 17(9): 861-862.
- [7] E Z. *The Technology of Tissue Culture and Its Application in Medical Research* (组织培养技术及其在医学研究中的应用) [M]. Beijing: Peking Union of Medical College Press, 2004.
- [8] Li C Y, Li T, Yu S Z. Study of retrovirus-mediated HSV-tk gene/GCV system therapy for glioma [J]. *Stroke Nerv Dis* (卒中与神经疾病), 2000, 7(1): 10-13.
- [9] Kumari M V. Scavenging activity of "beta-catechin" on reactive oxygen species generated by photosensitization of riboflavin [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, 38(6): 1163.
- [10] Dai D Z, Chen S H, Fen Y. Tea polyphenols and quercetin preventing the heart, brain and liver from the injury by free radicals in comparison with ascorbic acid [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2004, 2(4): 223-231.