

## 表没食子儿茶素没食子酸酯对肝细胞氧化损伤的初步研究

黄丰<sup>1,2</sup>, 肖德强<sup>1,2</sup>, 高伟<sup>1,2</sup>, 崔秀<sup>3</sup>, 邓志杰<sup>4</sup>, 赵静芳<sup>5</sup>, 鲁力<sup>2</sup>

1. 广西医科大学公共卫生学院, 广西 南宁 530021;
2. 广西高校高发疾病预防与控制研究重点实验室, 广西 南宁 530021;
3. 桂林市妇幼保健院临床营养科, 广西 桂林 541000;
4. 南宁市第二人民医院临床营养科, 广西 南宁 530031;
5. 广西国际壮医医院临床营养科, 广西 南宁 530200

**【摘要】** 目的 观察表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对正常人 HL7702 肝细胞氧化损伤的作用。方法 以正常人 HL7702 肝细胞为研究对象,用不同浓度 EGCG (0  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、40  $\mu\text{g/mL}$ 、80  $\mu\text{g/mL}$ 、160  $\mu\text{g/mL}$ )处理细胞 1 h、12 h、24 h,均以 0  $\mu\text{g/mL}$  EGCG 浓度组为对照组。倒置显微镜观察细胞形态,MTT 法检测细胞存活率,DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内活性氧(ROS),生化分析检测细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)的含量。结果 EGCG 浓度在 40  $\mu\text{g/mL}$  以下时,对肝细胞存活率下降无明显影响,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );且 5  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$  EGCG 处理 24 h 后的肝细胞存活率分别为(108.34 $\pm$ 4.12)%、(109.59 $\pm$ 3.14)%,与对照组的(100.00 $\pm$ 3.40)%比较,细胞存活率明显提高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );80  $\mu\text{g/mL}$  EGCG 处理细胞 1 h 后,ROS 为(5.36 $\pm$ 0.68)%,与对照组的(3.88 $\pm$ 0.10)%比较明显增多,差异有统计学意义( $P<0.05$ );80  $\mu\text{g/mL}$  EGCG 处理细胞 24 h,与对照组的细胞存活率[(100.00 $\pm$ 3.40)%]、LDH [(168.89 $\pm$ 4.90) U/L]、ROS [(3.54 $\pm$ 0.68)%]比较,细胞存活率[(40.05 $\pm$ 7.83)%]明显降低,LDH [(195.48 $\pm$ 11.23) U/L]、ROS [(10.99 $\pm$ 1.54)%]显著升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );160  $\mu\text{g/mL}$  EGCG 作用肝细胞 1 h,与对照组的细胞存活率[(100.00 $\pm$ 2.23)%]、LDH [(163.89 $\pm$ 5.37) U/L]、ROS [(3.88 $\pm$ 0.10)%]比较,肝细胞存活率[(79.87 $\pm$ 4.72)%]明显降低,LDH [(200.72 $\pm$ 13.45) U/L]、ROS [(8.14 $\pm$ 0.29)%]明显升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );160  $\mu\text{g/mL}$  EGCG 作用肝细胞 12 h、24 h,细胞存活率分别为(16.00 $\pm$ 0.99)%、(11.11 $\pm$ 0.41)%,LDH 分别为(199.21 $\pm$ 13.11) U/L、(435.71 $\pm$ 25.84) U/L,与对照组的细胞存活率[(100.00 $\pm$ 0.34)%、(100.00 $\pm$ 3.40)%]和 LDH[(169.56 $\pm$ 3.55) U/L、(168.89 $\pm$ 4.90) U/L]比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),同时显微镜下可见大量细胞死亡。结论 低剂量 EGCG (<40  $\mu\text{g/mL}$ )对正常人 HL7702 肝细胞无明显损伤作用,并具有一定的促增殖作用,高剂量下(>80  $\mu\text{g/mL}$ )可明显增加肝细胞氧化损伤,且随 EGCG 作用浓度、作用时间的增加损伤也增加。

**【关键词】** 表没食子儿茶素没食子酸酯;活性氧;HL7702;氧化损伤;LDH;细胞存活率

**【中图分类号】** R329.2<sup>5</sup> **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)10-1238-05

**Effect of epigallocatechin gallate on oxidative damage in hepatocytes.** HUANG Feng<sup>1,2</sup>, XIAO De-qiang<sup>1,2</sup>, GAO Wei<sup>1,2</sup>, CUI Xiu<sup>3</sup>, DENG Zhi-jie<sup>4</sup>, ZHAO Jing-fang<sup>5</sup>, LU Li<sup>1,2</sup>. 1. Department of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, CHINA; 2. Guangxi Colleges and Universities Key Laboratory of Prevention and Control of Highly Prevalent Diseases, Nanning 530021, Guangxi, CHINA; 3. Department of Clinical Nutrition, Guilin Maternal and Child Health Hospital, Guilin 541000, Guangxi, CHINA; 4. Department of Clinical Nutrition, Nanning Second People's Hospital, Nanning 530031, Guangxi, CHINA; 5. Department of Clinical Nutrition, Guangxi International Zhuang Medicine Hospital, Nanning 530200, Guangxi, CHINA

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of epigallocatechin gallate (EGCG) on oxidative damage of human normal HL7702 liver cells. **Methods** Human normal HL7702 liver cells were treated with EGCG at different concentrations (0  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ , 40  $\mu\text{g/mL}$ , 80  $\mu\text{g/mL}$ , 160  $\mu\text{g/mL}$ ) for 1 h, 12 h and 24 h, respectively. The 0  $\mu\text{g/mL}$  EGCG treated cells was used as the control for each treated cells. Cell morphology was observed by inverted microscope. MTT assay was used to detect cell viability. The reactive oxygen species (ROS) in the cells were measured by DCFH-DA fluorescence probe, and biochemical analysis was used to measure the contents of lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant of cells. **Results** When the treatment concentration was below 40  $\mu\text{g/mL}$ , EGCG showed no obvious effect on the decrease of survival rate of hepatocytes ( $P>0.05$ ). The survival rates of hepatocytes after treatment with 5  $\mu\text{g/mL}$  and 20  $\mu\text{g/mL}$  EGCG for 24 h were (108.34 $\pm$ 4.12)% and (109.59 $\pm$ 3.14)%, which were significantly improved as compared with (100.00 $\pm$ 3.40)% of the control ( $P<0.05$ ). ROS after treatment with 80  $\mu\text{g/mL}$  EGCG for 1 h was (5.36 $\pm$ 0.68)%, which was significantly increased as compared with (3.88 $\pm$ 0.10)% of the control ( $P<0.05$ ). After treatment with 80  $\mu\text{g/mL}$  EGCG more than 24 h, the cell survival rate was (40.05 $\pm$ 7.83)%, significantly reduced as compared with (100.00 $\pm$ 3.40)% of the control, and LDH, ROS were (195.48 $\pm$ 11.23) U/L, (10.99 $\pm$ 1.54)%, significantly increased as compared with (168.89 $\pm$ 4.90) U/L, (3.54 $\pm$ 0.68)% of control, all with statistically significant differ-

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360383)

通讯作者:鲁力,E-mail:luligx@163.com

ences ( $P < 0.05$ ). After treatment with 160  $\mu\text{g/mL}$  EGCG for 1 h, the survival rate of liver cells was  $(79.87 \pm 4.72)\%$ , significantly reduced as compared with  $(100.00 \pm 2.23)\%$  of the control, and LDH, ROS were  $(200.72 \pm 13.45)$  U/L,  $(8.14 \pm 0.29)\%$ , which were significantly increased as compared with  $(163.89 \pm 5.37)$  U/L,  $(3.88 \pm 0.10)\%$  of control, all with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). When cells were treated with 160  $\mu\text{g/mL}$  EGCG for 12 h and 24 h, a large number of dead cells were observed under inverted microscope, and liver cell survival rate, LDH were  $(16.00 \pm 0.99)\%$  and  $(11.11 \pm 0.41)\%$ ,  $(199.21 \pm 13.11)$  U/L and  $(435.71 \pm 25.84)$  U/L, versus  $(100.00 \pm 0.34)\%$  and  $(100.00 \pm 3.40)\%$ ,  $(169.56 \pm 3.55)$  U/L and  $(168.89 \pm 4.90)$  U/L of the control cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Low dose EGCG ( $< 40 \mu\text{g/mL}$ ) has no obvious damage effect on normal hepatocytes and has a certain effect of promoting cell proliferation. High dose EGCG ( $> 80 \mu\text{g/mL}$ ) can significantly increase the oxidative damage of hepatocytes, and the damage also increases with the increase of time and drug concentration.

**【Key words】** Epigallocatechin gallate; Reactive oxygen species (ROS); HL7702 cells; Oxidative damage; Lactate dehydrogenase (LDH); Cell survival rate

蔬菜、水果等天然植物性食物中含有多种生物活性成分—植物化学物,主要包括多酚类化合物、有机硫化物、萜类和类胡萝卜素等,具有抗癌、抗氧化、免疫调节、降低胆固醇等多种生理功能。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是绿茶中主要存在的一种天然多酚类植物化学物,EGCG的多种生物活性,在体内外已经得到了广泛的研究,主要有抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡等生物学作用。有研究表明,EGCG可拮抗鱼藤酮所致PC12细胞的凋亡<sup>[1]</sup>、保护脂多糖诱导的胶质细胞炎症损伤<sup>[2]</sup>、抑制亚硫酸诱导的心肌细胞氧化损伤<sup>[3]</sup>等。但同时,在研究中发现,EGCG不仅具有一定抗氧化损伤作用,在一定条件下还具有致氧化损伤的作用。在研究EGCG对神经节细胞RGC-5的促氧化与抗氧化研究中,EGCG作用可以产生过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )。低浓度EGCG作用产生的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 对细胞具有抗氧化损伤作用,而高浓度EGCG作用下,具有促氧化损伤的作用<sup>[4]</sup>。因此在研究EGCG的抗氧化损伤的保护作用过程中,研究EGCG的促氧化损伤作用同样具有重要意义。本次实验通过观察在不同浓度EGCG作用下,正常肝细胞存活率、细胞培养液中乳酸脱氢酶含量、细胞中活性氧自由基生成的变化情况,初步了解EGCG对正常肝细胞的氧化损伤作用,为进一步研究EGCG的抗氧化损伤作用提供基础。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器** EGCG(纯度 $> 98\%$ )购于美国Sigma公司。EGCG用无菌磷酸盐缓冲溶液(PBS)(北京索莱宝)溶解成10 mg/mL的存储液,并用0.22  $\mu\text{m}$ 膜过滤器过滤后于4 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存,用时再用1640完全培养基稀释成不同浓度,现用现配。噻唑蓝(MTT)、磷酸盐缓冲液(PBS)购于北京索莱宝,活性氧检测试剂盒(ROS Assay Kit)购于上海碧云天,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购于南京建成。全波长酶标仪(美国,赛默飞)。流式细胞仪(美国,贝克曼)。

**1.2 细胞培养与分组处理** 正常人HL7702肝细胞(同实验室课题组赠送,购于武汉普诺赛生命科技有限公司),用含10%胎牛血清(美国Gibco)和1%青链霉素混合液(北京索莱宝)的1640(美国Gibco)完全培养基,在37 $^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中培养,待细胞生在状态良好后,用0.25%胰酶消化细胞,收集、离心、再重悬,根

据实验需要种于96孔板或者6孔板中,待细胞贴壁后进行后续分组实验。细胞分为不同浓度EGCG处理组(分别用0  $\mu\text{g/mL}$ 、5  $\mu\text{g/mL}$ 、10  $\mu\text{g/mL}$ 、20  $\mu\text{g/mL}$ 、40  $\mu\text{g/mL}$ 、80  $\mu\text{g/mL}$ 、160  $\mu\text{g/mL}$  EGCG处理细胞1 h、12 h、24 h)。

**1.3 细胞形态学观察和测定细胞增殖活力** 采用MTT法测7702肝细胞存活率。细胞在对数生长期时,胰酶消化细胞,以3 000个/孔浓度接种于96孔板,每孔100  $\mu\text{L}$ 。分组处理细胞后,倒置显微镜下观察细胞形态及密度并拍照记录。用PBS清洗细胞3遍,然后加入含100  $\mu\text{L}$  1640培养基和20  $\mu\text{L}$  MTT的溶液,37 $^\circ\text{C}$ 继续孵育4 h。小心吸掉培养液,每孔加入150  $\mu\text{L}$  DMSO,酶标仪设置37 $^\circ\text{C}$ 、间震10 min、波长490 nm处测各孔吸光度(A)值,各组设6个复孔。细胞增殖活力( $\%$ )= $(A_{\text{处理}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

**1.4 检测细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)活性** 细胞以 $4 \times 10^4$ 个/mL,每孔2 mL种于6孔板中,待细胞贴壁并按前述分组处理细胞后,直接吸取培养上清,按照试剂盒说明进行LDH酶含量检测。

**1.5 检测细胞活性氧(ROS)** 利用荧光探针DCFH-DA检测各组细胞活性氧。细胞以 $4 \times 10^4$ 个/mL,每孔2 mL接种于6孔板,待细胞贴壁后,按前述分组处理细胞,实验结束后,无血清1640培养液清洗细胞三遍,每孔加入10  $\mu\text{M}$  DCFH-DA 1 mL,37 $^\circ\text{C}$ 细胞培养箱内孵育20 min。然后再用无血清1640培养液洗涤细胞三次,每孔加入0.5 mL PBS,小心用细胞铲收集细胞并混匀,1 h内流式细胞仪上机检测。

**1.6 统计学方法** 应用SPSS19.0软件进行统计分析,实验计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度EGCG对7702肝细胞形态学影响** EGCG在40  $\mu\text{g/mL}$ 以下对7702肝细胞形态变化无影响。80  $\mu\text{g/mL}$  EGCG处理细胞12 h后可见细胞拉长,出现钉状突起;作用24 h,细胞密度降低。160  $\mu\text{g/mL}$  EGCG处理细胞1 h后可见细胞变圆、收缩、出泡;作用12 h,已见细胞膜破裂,细胞大量溶解;作用24 h,细胞几乎全部死亡,见图1。



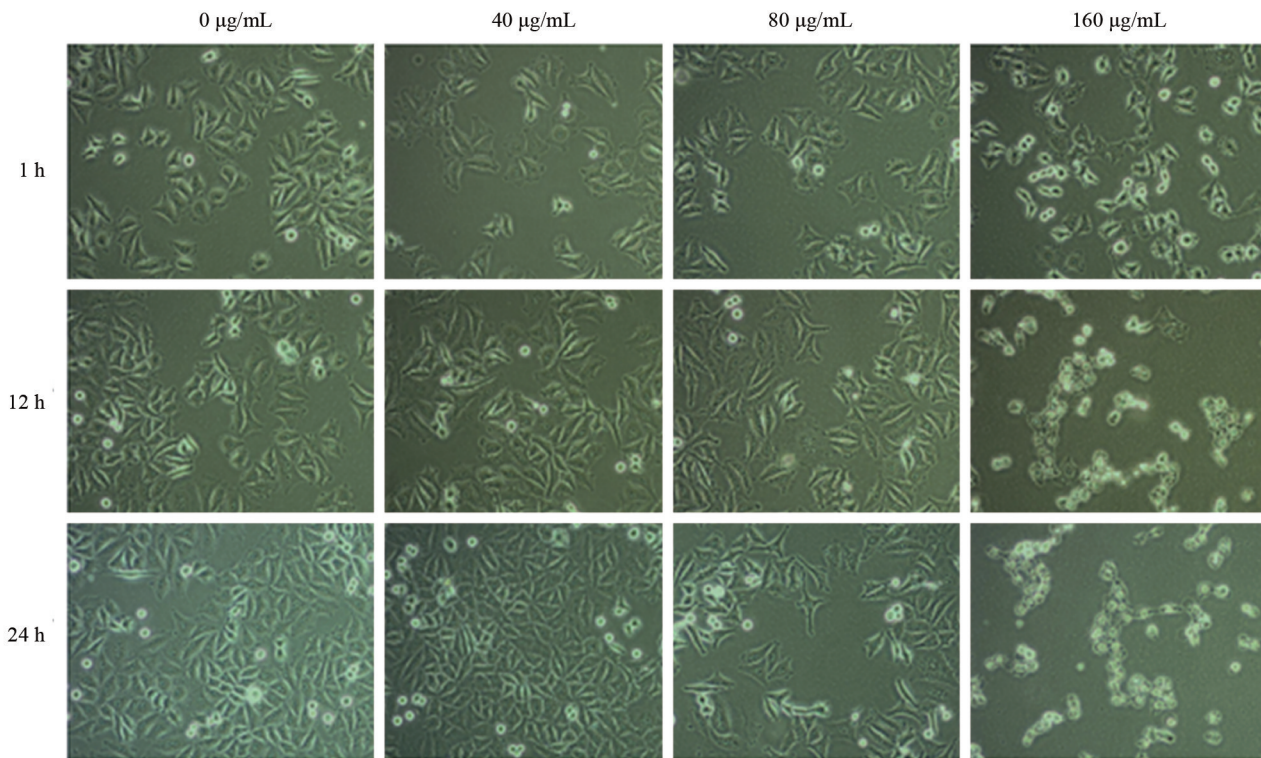


图1 不同浓度EGCG处理对7702肝细胞形态学的改变(10×10)

2.2 EGCG对7702肝细胞存活率的影响 MTT结果显示,小于40 µg/mL EGCG处理细胞12 h以上,可增加细胞存活率,其中5 µg/mL、20 µg/mL EGCG处理细胞24 h,与对照组(0 µg/mL)比较,细胞存活率显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。80 µg/mL EGCG处理细胞1 h组比较,均明显降低细胞存活率,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且80 µg/mL EGCG处理组中,24 h组细胞存活率明显低于12 h组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。用160 µg/mL EGCG处理细胞1 h、12 h、24 h,与对照组比较,均能明显降低细胞存活率,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );作用12~24 h,与160 µg/mL EGCG处理细胞1 h比较,细胞存活率进一步降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。各组细胞存活率曲线图见图2。

表1 不同浓度EGCG作用对肝细胞存活率的影响(%,  $\bar{x} \pm s, n=6$ )

EGCG浓度(µg/mL)	处理时间		
	1 h	12 h	24 h
0	100.00±2.23	100.00±0.34	100.00±3.40
5	99.63±2.97	104.95±2.84	108.34±4.12 <sup>a</sup>
10	100.68±1.59	102.97±7.27	106.07±2.37
20	96.54±0.79	104.45±5.78	109.59±3.14 <sup>a</sup>
40	100.11±2.24	101.48±0.38	98.10±4.44
80	97.75±3.77	78.34±5.17 <sup>ab</sup>	40.05±7.83 <sup>abc</sup>
160	79.87±4.72 <sup>a</sup>	16.00±0.99 <sup>ab</sup>	11.11±0.41 <sup>ab</sup>

注:与0 µg/mL组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与相同浓度的EGCG作用1 h组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与相同浓度的EGCG作用12 h组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

2.3 不同浓度EGCG对7702肝细胞培养上清液中LDH酶含量的影响 小于40 µg/mL EGCG处理细胞对培养液中LDH含量无明显影响。80 µg/mL

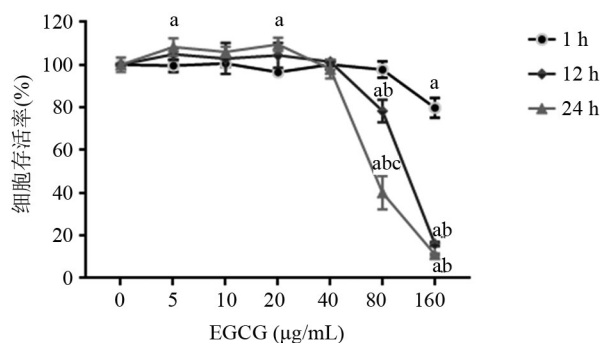


图2 不同浓度EGCG对正常肝细胞存活率的影响

注:与0 µg/mL组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与相同浓度的EGCG作用1 h组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与相同浓度EGCG作用12 h组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

EGCG处理细胞24 h,细胞培养上清液中LDH酶含量明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。用160 µg/mL EGCG处理细胞1 h、12 h、24 h后,可见细胞培养上清液中LDH酶含量显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且24 h处理组,LDH酶含量明显高于1 h、12 h组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表2。

2.4 不同浓度EGCG对7702肝细胞内活性氧(ROS)的影响 流式细胞仪检测发现,用160 µg/mL EGCG处理细胞1 h即可见ROS产生增多,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );当作用时间大于12 h以上,因细胞大量死亡无法测定细胞内ROS。用80 µg/mL EGCG处理细胞1 h、12 h、24 h,均能明显增加ROS的产生,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且随着作用时间的增加ROS的产生也增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表3。

表2 不同浓度 EGCG 作用对细胞培养液中 LDH 的影响(U/L,  $\bar{x} \pm s, n=3$ )

EGCG 浓度 ( $\mu\text{g/mL}$ )	处理时间		
	1 h	12 h	24 h
0	163.89 $\pm$ 5.37	169.56 $\pm$ 3.55	168.89 $\pm$ 4.90
5	162.21 $\pm$ 16.68	161.40 $\pm$ 9.61	158.43 $\pm$ 11.70
10	164.32 $\pm$ 20.86	163.26 $\pm$ 20.85	164.36 $\pm$ 20.87
20	155.70 $\pm$ 7.76	154.90 $\pm$ 4.61	158.37 $\pm$ 9.33
40	160.06 $\pm$ 13.48	166.15 $\pm$ 6.02	168.73 $\pm$ 7.99
80	165.78 $\pm$ 2.33	168.77 $\pm$ 7.92	195.48 $\pm$ 11.23 <sup>a</sup>
160	200.72 $\pm$ 13.45 <sup>a</sup>	199.21 $\pm$ 13.11 <sup>a</sup>	435.71 $\pm$ 25.84 <sup>abc</sup>

注:与 0  $\mu\text{g/mL}$  组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与相同浓度的 EGCG 作用 1 h 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与相同浓度的 EGCG 作用 12 h 组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

表3 不同浓度 EGCG 作用对细胞 ROS 的影响(% ,  $\bar{x} \pm s, n=3$ )

EGCG 浓度( $\mu\text{g/mL}$ )	处理时间		
	1 h	12 h	24 h
0	3.88 $\pm$ 0.10	4.50 $\pm$ 0.99	3.54 $\pm$ 0.68
5	2.58 $\pm$ 0.69	2.84 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	2.61 $\pm$ 0.71
10	4.77 $\pm$ 0.94	4.53 $\pm$ 0.82	4.71 $\pm$ 0.90
20	4.68 $\pm$ 1.10	5.24 $\pm$ 0.43	4.44 $\pm$ 1.47
40	4.94 $\pm$ 1.09	5.01 $\pm$ 0.49	4.89 $\pm$ 1.04
80	5.36 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	7.71 $\pm$ 0.82 <sup>ab</sup>	10.99 $\pm$ 1.54 <sup>ac</sup>
160	8.14 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	-	-

注:与 0  $\mu\text{g/mL}$  组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与相同浓度的 EGCG 作用 1 h 组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与相同浓度的 EGCG 作用 12 h 组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨论

多项研究表明,多酚类化合物表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)具有很强的抗氧化活性,其机制主要是通过清除自由基、参与调节氧化和抗氧化酶系统等保护多种环境因素诱导的体内外细胞氧化损伤<sup>[5]</sup>。但在研究其抗氧化活性的同时,发现当作用条件不同时,EGCG 对细胞具有一定的氧化损伤作用。在一般的细胞培养过程中,EGCG 不稳定,可发生自氧化反应,增加细胞内活性氧(ROS),或者通过芬顿(Fenton)反应间接产生  $\text{OH}^{\cdot}$ <sup>[6-7]</sup>。YOUNG 等<sup>[8]</sup>研究表明 EGCG 保护一氧化碳诱导的人牙髓细胞凋亡,其机制主要是通过清除自由基。而 ELBLING 等<sup>[9]</sup>研究表明自氧化产生的  $\text{H}_2\text{O}_2$  在 EGCG 介导的抗氧化保护中发挥重要作用。同时,LAMBERT 等<sup>[10]</sup>研究表明 ROS 的产生在 EGCG 对癌细胞系的促凋亡作用中发挥着重要作用。

ROS 是一种具有高反应活性的自由基或分子,包括氧自由基如超氧阴离子( $\text{O}_2^{\cdot-}$ )、羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )和非自由基氧衍生物过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )等<sup>[11]</sup>。ROS 主要在线粒体中产生,受细胞内和线粒体内多种抗氧化系统调节,正常生理条件下,细胞内 ROS 处于平衡状态<sup>[12]</sup>。当受外界因素刺激,体内 ROS 的产生超出机体自身的清除能力,氧化与抗氧化作用失衡,造成 ROS 大量累积,过多的 ROS 可直接攻击线粒体膜,造成膜通透性改变,也可诱导生物膜的脂质过氧化,最终导致细胞氧化损伤和细胞凋亡<sup>[13-14]</sup>。乳酸脱氢酶(LDH)在胞质内含量非常丰富,细胞处于正常状态下,LDH 不能通过细胞膜,但当细胞受到损伤或死亡时便可释放到细

胞外中。通过对细胞培养液中 LDH 水平的测定,可反映肝细胞的损伤程度<sup>[15]</sup>。

本次实验中 EGCG 浓度在 40  $\mu\text{g/mL}$  以下时对肝细胞无明显损伤作用,并具有一定的促增殖作用。80  $\mu\text{g/mL}$  EGCG 作用细胞 1 h 即可见 ROS 产生增多;作用 12 h 显微镜下观察可见细胞拉长,出现钉状突等形态学改变;作用 24 h 以上,细胞存活率降低明显降低,LDH、ROS 显著升高。160  $\mu\text{g/mL}$  EGCG 作用肝细胞 1 h,即可见肝细胞存活率明显降低,LDH、ROS 明显升高;作用细胞 12 h,镜下可见大量细胞死亡,肝细胞存活率显著降低,同时细胞培养液中 LDH 明显升高;作用 24 h,肝细胞存活率明显降低,LDH、ROS 含量明显增加,表明 EGCG 在 80  $\mu\text{g/mL}$  以上浓度可对肝细胞产生损伤,同时,随着作用浓度、时间的增加,损伤也增加。

综上所述,低剂量 EGCG (<40  $\mu\text{g/mL}$ )对正常人 HL7702 肝细胞无明显损伤作用,并具有一定的促增殖作用。高剂量 EGCG (>80  $\mu\text{g/mL}$ )处理对肝细胞具有氧化损伤作用,且随着浓度和作用时间的增加,氧化损伤也增加,其作用机制可能与增加氧自由基和脂质过氧化水平而产生氧化损伤作用。此次结果为以后进一步研究 EGCG 用于保护其他因素所致肝细胞氧化损伤提供基础。同时,在日常中,应避免 EGCG 的过量使用,市场销售含 EGCG 或其它具有抗氧化活性的植物化学物质的功能性食品时,应在医药控制之内。

### 参考文献

- [1] 郑建波,张兆辉. EGCG 拮抗鱼藤酮致 PC12 细胞凋亡的研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(9): 41-44.
- [2] 陈华,苗加伟,李晶,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对脂多糖诱导胶质细胞炎症的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2016, 16: 3913-3914.
- [3] 赵良渊,张秋华. 表没食子儿茶素没食子酸酯对亚硫酸诱导的心肌细胞氧化损伤的抑制作用[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(2): 292-293.
- [4] 郑斌,李光宇,李佳睿,等. 绿茶提取物 EGCG 对视神经节细胞 RGC-5 的促氧化和抗氧化作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(14): 3924-3926.
- [5] 刘婷婷,孟馨. 表没食子儿茶素没食子酸酯抗氧化作用机制的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2016, 31(6): 919-923.
- [6] 陈怡君,熊立瑰,黄建安,等. EGCG 对细胞的促氧化作用研究进展[J]. 茶叶科学, 2015, 35(2): 130-136.
- [7] SANG S, LEE MJ, HOU Z, et al. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(24): 9478-9484.
- [8] YOUNG PARK S, JEONG YJ, KIM SH, et al. Epigallocatechin gallate protects against nitric oxide-induced apoptosis via scavenging ROS and modulating the Bcl-2 family in human dental pulp cells [J]. J Toxicol Sci, 2013, 38(3): 371-378.
- [9] ELBLING L, HERBACEK I, WEISS RM, et al. Hydrogen peroxide mediates EGCG-induced antioxidant protection in human keratinocytes [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(9): 1444-1452.
- [10] LAMBERT JD, ELIAS RJ. The antioxidant and pro-oxidant activi-



## 不同基础肾功能心力衰竭患者心脏再同步化治疗术后预后比较

罗承志<sup>1</sup>, 朱士彦<sup>1</sup>, 江文科<sup>2</sup>, 陈剑泉<sup>2</sup>广东医科大学附属第三医院肾病科<sup>1</sup>、心内科<sup>2</sup>, 广东 佛山 528318

**【摘要】** 目的 观察不同基础肾功能心力衰竭患者实施心脏再同步化治疗(CRT)术后预后的差异。方法 前瞻性选择 2014 年 1 月至 2016 年 1 月广东医科大学附属第三医院心内科收治的 60 例心力衰竭患者为研究对象, 所有患者拟行 CRT 治疗, 根据术前肾小球滤过率(GFR)将患者分为 A 组[GFR $\geq$ 90 mL/(min $\cdot$ 1.73 m<sup>2</sup>), 20 例]、B 组[60 mL/(min $\cdot$ 1.73 m<sup>2</sup>) $\leq$ GFR $\leq$ 89 mL/(min $\cdot$ 1.73 m<sup>2</sup>), 20 例]和 C 组[GFR $<$ 60 mL/(min $\cdot$ 1.73 m<sup>2</sup>), 20 例]。观察三组患者术前(T0)、术后 1 个月(T2)、6 个月(T3)的 GFR、血清利钠肽(BNP)、左室射血分数(LVEF)、左室收缩末容积(LVESV)、纽约心脏协会(NYHA)心功能分级的变化, 并观察患者预后的差异。**结果** 三组患者术后 1 个月 BNP、LVESV、NYHA 心功能分级显著下降, LVEF 显著上升, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); 术后 6 个月, A 组和 B 组患者的 BNP、LVESV、NYHA 心功能分级继续下降, LVEF 继续上升, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ), 但 C 组 BNP、LVESV、NYHA 心功能分级、LVEF 比较, 差异均无统计学意义( $P>0.05$ ); C 组患者的全因死亡率为 25.0%, 明显高于 B 组的 5.0% 和 A 组的 0, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); C 组中位生存期(2.68 $\pm$ 0.24)年, 明显少于 B 组和 A 组[(3.32 $\pm$ 0.51)年、(3.56 $\pm$ 0.57)年], 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); A 组、B 组和 C 组患者的三年生存率分别为 96.52%、93.02%、71.03%, 差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** CRT 术前基础肾功能对心力衰竭患者近远期疗效影响较大, 完善术前肾功能评估可指导 CRT 治疗。

**【关键词】** 心力衰竭; 肾功能; 再同步化治疗; 预后; 肾小球滤过率**【中图分类号】** R541.6 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2019)10-1242-04

**Comparison of prognosis after cardiac resynchronization therapy in patients with different basic renal function and heart failure.** LUO Cheng-zhi<sup>1</sup>, ZHU Shi-yan<sup>1</sup>, JIANG Wen-ke<sup>2</sup>, CHEN Jian-quan<sup>2</sup>. Department of Nephrology<sup>1</sup>, Department of Cardiology<sup>2</sup>, the Third Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Foshan 528318, Guangdong, CHINA

**【Abstract】 Objective** To observe the difference of prognosis after cardiac resynchronization therapy (CRT) in patients with different basic renal failure and heart failure. **Methods** From January 2014 to January 2016, 60 patients with heart failure admitted to the Third Affiliated Hospital of Guangdong Medical University were prospectively selected. All patients underwent CRT treatment. According to preoperative glomerular filtration rate (GFR), the patients were divided into group A (GFR $>$ 90 mL/[min $\cdot$ 1.73 m<sup>2</sup>], 20 cases), group B (60 mL/[min $\cdot$ 1.73 m<sup>2</sup>) $<$ GFR $<$ 89 mL/[min $\cdot$ 1.73 m<sup>2</sup>], 20 cases), and group C (GFR $<$ 60 mL/[min $\cdot$ 1.73 m<sup>2</sup>], 20 cases). The changes of GFR, serum natriuretic peptide (BNP), left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular end systolic volume (LVESV), and New York Heart Association (NYHA) cardiac function grading before operation (T0), 1 month (T2), 6 months (T3) after operation were observed, and the prognosis of the patients was compared. **Results** One month after operation, BNP, LVESV, NYHA cardiac function grading decreased significantly ( $P<0.05$ ), and LVEF increased significantly ( $P<0.05$ ). Six months after operation, BNP, LVESV, NYHA cardiac function grading continued to decline ( $P<0.05$ ) and LVEF continued to rise ( $P<0.05$ ) in group A and group B, but BNP, LVESV, NYHA cardiac function grading and LVEF did not change significantly in group C ( $P>0.05$ ). The all-cause mortality of group C was 25.0%, significantly higher than 5.0% of group B and 0 of group A ( $P<0.05$ ), and the median survival time of group C was 2.68 $\pm$ 0.24, significantly lower than 3.32 $\pm$ 0.51 of group B and 3.56 $\pm$ 0.57 of group A ( $P<0.05$ ). The three-year survival rates of the three groups were 96.52%, 93.02%, and

基金项目:广东省佛山市卫生和计生局医学科研课题立项(编号:20190338)

通讯作者:罗承志, E-mail: LCz20190338@126.com

\*\*\*\*\*

ties of green tea polyphenols: A role in cancer prevention [J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 501(1): 65-72.

[11] GAO X, LI C, TANG Y, et al. Effect of hedyotis diffusa water extract on protecting human hepatocyte cells (LO2) from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity [J]. Pharm Biol, 2016, 54(7): 1148.

[12] SCHIEBER M, CHANDEL NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress [J]. Curr Biol, 2014, 24(10): R453-462

[13] 董峰, 杨佳, 李向阳, 等. 镉通过引发氧化应激和线粒体损伤诱导

PK-15 细胞凋亡[J/OL]. 中国生物化学与分子生物学报. https://doi.org/10.13865/j.cnki.cjmb.2018.11.08

[14] QI S, FENG Z, LI Q, et al. Inhibition of ROS-mediated activation Src-MAPK/AKT signaling by orientin alleviates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in PC12 cells [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 3973-3984.

[15] 郑冲, 叶建方, 刘泳廷. 亚硫酸钠对人肝细胞 L-02 损伤机制的研究 [J]. 微量元素与健康研究, 2016, 33(4): 1-3.

(收稿日期:2019-02-02)