

刘均,刘雅丽,夏兵.茶多酚对动物健康的保护作用研究进展[J].江苏农业科学,2018,46(12):14-19.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.003

茶多酚对动物健康的保护作用研究进展

刘均¹,刘雅丽²,夏兵¹

(1. 中华全国供销合作总社杭州茶叶研究院,浙江杭州 310020; 2. 浙江省畜牧技术推广总站,浙江杭州 310021)

摘要:健康是动物维持生命的基本前提,茶多酚是茶中多酚类物质的总称,具有多种生物活性功能,能够通过多种途径调节并增强机体抵抗力。本文在阐述茶多酚对主要免疫器官发育影响的基础上,综述茶多酚对特异性免疫系统、非特异性免疫系统、抗氧化系统及肠道微生态调节作用等多种调控作用的影响,并深入报道了茶多酚对细胞功能代谢的影响以及恢复机制的作用途径,最后也指出了今后该领域需要进一步研究的问题和研究方向。

关键词:茶多酚;营养调控;动物健康;免疫;肠道微生物

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)12-0014-05

茶多酚(tea polyphenols)是茶叶中多酚类物质的统称,占干茶的25%~35%,不仅可以抑制有害菌的生长,而且还具有抗氧化、抗衰老及抗辐射等多种生物活性功能。自新中国成立以来,我国茶产业包括茶园面积、茶叶单位面积年产量等都取得了快速发展与提高,但世界范围内茶叶消费依旧低迷,造成了极其严重的茶产能过剩现象,而且这还不包括未利用的夏秋茶、低档茶等茶叶资源。充分利用年剩量茶资源以及拓展茶多酚在动物健康上的应用不仅可以促进茶产业功能延伸及发展,而且更重要的是茶多酚能够影响并增强动物机体抵抗力,促进健康产业新发展。本文主要围绕茶多酚对机体的免疫机能,分别从免疫器官发育、非特异性免疫系统、特异性免疫系统、抗氧化系统以及肠道微生态调节作用等的影响作用作如下整体性综述。

1 茶多酚对免疫器官发育的影响

1.1 诱导性损伤模型动物

茶多酚能够调节和改善诱导损伤模型动物免疫器官生长发育从而缓解机体抗损伤作用。器官质量在一定程度上也可以反映机体代谢的需要,其中免疫器官质量的增加表明机体抗病原微生物感染的能力在一定程度上得到了提升。初晓等研究表明,*D*-半乳糖能够致衰小鼠造成胸腺指数、脾脏指数等免疫脏器指数显著下降,但茶多酚治疗后能够有效反转这一现象,显著增加胸腺指数、脾脏指数等脏器指数,从而显著提升免疫相关能力^[1]。刘淑红等研究发现,Lewis 能够诱导小鼠制作肺癌模型小鼠,并造成胸腺质量及其指数减轻、脾脏指数升高,但茶多酚治疗后能够有效降低胸腺指数、脾脏指数等,而且还能有效提高 SOD、GSH-Px 等活性水平,从而表现出免疫抑制作用与抗氧化作用保护机体健康^[2]。

收稿日期:2017-01-10

基金项目:浙江省公益技术研究农业项目(编号:2015C32109)。

作者简介:刘均(1990—),男,安徽安庆人,硕士,助理研究员,主要从事茶资源资源化应用及跨界应用。E-mail: heyliujun888@163.com。

通信作者:夏兵,硕士,工程师,主要从事功能性茶制品开发及其在动物营养中高效应用的研究。E-mail: heyb888@163.com。

1.2 正常动物

在动物基础日粮中添加茶多酚可以影响并促进免疫相关器官生长发育从而增强机体抗感染能力。刘晓华等在公雏基础日粮中添加梯度浓度的茶多酚,结果表明茶多酚可以显著促进肉仔鸡胸腺器官的生长,并且得出的最佳剂量 ≤ 40 mg/kg^[3]。刘德义等在固始鸡基础日粮中添加0.25%的茶多酚,可以显著增加2周龄固始鸡的法氏囊质量;饲料中添加0.50%的茶多酚,可以显著增加4周龄固始鸡的法氏囊质量及6周龄固始鸡的胸腺质量,但对脾脏质量的变化无显著性影响^[4]。李忠浩等研究发现,茶多酚饲喂蛋鸡后能显著提升产蛋鸡脾脏指数,从而增强免疫能力^[5]。易先国研究表明,在固始鸡基础日粮中添加茶多酚后能明显促进固始鸡在前期生长过程中胸腺、脾脏、法氏囊等免疫器官的发育进程^[6]。徐奇友等研究表明,在虹鳟基础日粮中添加茶多酚后能显著提高虹鳟肝体比、脏体比等指数,从而提高机体免疫机能^[7]。

2 茶多酚对免疫系统的影响

茶多酚可以影响并调节非特异性免疫系统(如固有免疫细胞、补体、细胞因子等生物活性及表达量)和特异性免疫系统(如B淋巴细胞、T淋巴细胞活性及免疫相关蛋白含量)的变化,从而调节畜禽机体免疫机能的提升。

2.1 非特异性免疫反应

非特异性免疫反应指动物在漫长的生物进化过程中所逐步形成与完善的一种遗传特性,后天的生活环境接触因素能够影响和调节机体的非特异性免疫防御机能。

2.1.1 固有免疫细胞

2.1.1.1 NK 细胞 NK 细胞即自然杀伤细胞,在机体防御中发挥重要作用,其主要作用是识别靶细胞及杀伤介质^[8]。NK 细胞不但可以抗病毒、抗肿瘤、抗癌,而且还参与机体的免疫反应及超敏反应等。因此,NK 细胞活性可以作为评价机体免疫防御机能的一个辅助性参考指标。崔英等研究发现,茶多酚可以显著增强肝癌高危人群的 NK 细胞活性^[9];此外,潘喜华等研究发现茶多酚也可以显著提升小鼠的 NK 细胞活性^[10]。

2.1.1.2 巨噬细胞 巨噬细胞在机体的防御体系中扮演着“清道夫”的角色,由骨髓中的前体细胞分化的单核细胞分化而来,通过固定或者游离的细胞吞噬和消化机体内部的细胞残片或外侵的病原体等在体内参与特异性与非特异性免疫反应;另外还可以激活淋巴细胞或免疫细胞对特定病原体作出免疫反应。郭春宏等采用噻唑蓝 (MTT) 法监测小鼠脾淋巴细胞及巨噬细胞的增殖变化,研究表明茶多酚可以增强丝裂原诱导的小鼠淋巴细胞和巨噬细胞的增殖反应,能显著增强刀豆素 A (ConA) 处理的小鼠脾淋巴细胞及巨噬细胞的增殖反应^[11]。此外,潘喜华等研究发现茶多酚也可以显著增强小鼠巨噬细胞活性^[10]。初晓等研究发现, D - 半乳糖能够导致小鼠淋巴细胞转化能力以及腹腔巨噬细胞吞噬功能显著下降,但茶多酚治疗后能够明显改善这一现象,显著提升淋巴细胞转化能力及腹腔巨噬细胞的吞噬功能,说明茶多酚是一种免疫调节剂^[11]。

2.1.2 补体系统 茶多酚能够提高及增强补体活力。补体系统是由 30 多种可溶性蛋白质、补体受体和膜结合蛋白等组成的多分子系统,活化后具有酶的活性。它不但可以溶解靶细胞,还可以促进细胞吞噬及溶解病毒和炎症介质等,在机体免疫防御中起到功能辅助作用。李忠浩等在蛋鸡日粮中添加茶多酚,可以显著提高血清中补体 C3 和 C4 含量^[5]。李振等研究表明,茶多酚能激活巨噬细胞、NK 细胞和 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞,激活补体系统,提高抗体水平^[12]。此外,李鸿飞研究发现,茶多酚具有降低动脉粥样硬化模型兔的血清及组织匀浆中 C3 补体的功能,且剂量越高作用越显著^[13]。但李金龙研究表明,高浓度茶多酚对青鱼的补体系统存在负面影响,浓度为 500 mg/kg 的茶多酚能显著降低血清中补体 C3、C4 的活力^[14]。

2.1.3 细胞因子 细胞因子 (cytokine, CK) 是指免疫细胞 (主要包括单核细胞、巨噬细胞、NK 细胞等) 和某些非免疫细胞 (内皮细胞、表皮细胞、纤维母细胞等) 在受刺激后合成、分泌的一类生物活性蛋白,通过结合相应的受体调节细胞的生长与分化,同时还参与机体的免疫调控作用。

茶多酚保护组织诱导性损伤作用可能与抑制炎症相关因子的表达有关。CD8⁺ T 淋巴细胞分泌的细胞因子与受体的结合可能与白癜风诱发相关,许发明等研究表明,茶多酚可以抑制白癜风患者外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞分泌肿瘤坏死因子 (TNF - α),从而缓解和治疗白癜风症状^[15]。区锦莹等研究发现,四氯化碳能够造成小鼠急性肝损伤,但是经过绿茶提取物处理后能够明显降低肝组织中核因子 κ B (NF - κ B) 和 TNF - α 的表达水平,从而缓解和保护肝组织功能^[16]。此外,刘冬梅等研究表明,EGCG 能够显著降低 ConA 诱导小鼠血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 水平以及显著降低肝组织炎症因子 TNF - α 、白介素 - 17 (IL - 17) 水平,从而保护 ConA 对小鼠肝脏造成的诱导损伤作用^[17]。冯亮等利用酒精灌胃造成小鼠酒精性肝损伤后,经茶多酚治疗后可以显著降低血清 ALT 含量,显著降低肝脏 IL - 6、IL - 1 β 含量,从而缓解和减轻酒精灌胃造成的肝损伤作用^[18]。徐丽倩等使用百草枯染毒大鼠后造成大鼠肺及血清中转化生长因子 (TGF - β 1) 和低氧诱导因子 (HIF - 1 α) 分泌量显著上升,但是经过茶多酚治疗后能够显著抑制百草枯染毒大鼠肺及血清中 TGF -

β 1 和 HIF - 1 α 的分泌,从而缓解大鼠中毒症状^[19]。

茶多酚保护组织诱导性损伤可能与抑制趋化因子的表达有关。趋化因子的主要作用是吸引白细胞转移到感染部位的一些低分子量趋化因子,并增强炎症细胞的吞噬杀伤功能,直接参与炎症过程^[20]。刘冬梅等研究表明,EGCG 不仅可以显著降低 ConA 诱导小鼠肝组织中 TNF - α 和 γ 干扰素 (IFN - γ) 水平,而且还能显著降低肝组织中趋化因子 CXC 趋化因子受体 3 (CXCR3) 的表达,所以 EGCG 对肝脏诱导损伤的保护作用也可能与调节趋化因子有关^[21]。

研究表明,茶多酚保护组织诱导性损伤作用可能与抑制 Toll 受体 (toll - like receptors, TLRs) 的表达有关。TLRs 被激活后迅速开启炎症反应,但持续激活造成炎症因子高表达,并引发慢性炎症、免疫紊乱和其他 TLRs 相关疾病^[22]。刘冬梅等研究发现,ConA 能诱导小鼠肝组织中 TLR2 和 TLR3 过表达,但是 EGCG 治疗后能够显著抑制 TLR2 和 TLR3 的表达^[23]。

2.1.4 肠道黏膜免疫 动物肠道内寄存有数以亿计的微生物群体,在长期的进化过程中,肠黏膜主要依赖黏膜上皮和固有层内含有大量免疫细胞和免疫活性物质的屏障作用防止有害物质进入机体,在整个机体免疫防御中发挥着重要作用,是机体天然免疫的第 1 道“屏障”^[24]。李玲秀研究表明,茶多酚可以显著提高隐性感染鸡球虫肉鸡血清中 IL - 2、IL - 15、IL - 18、IgM、IgG 和肠道中 sIgA 的含量,表明茶多酚具有促进鸡肠道黏膜免疫及细胞免疫的作用^[25]。

2.2 特异性免疫反应

特异性免疫是一种针对特定病原的后天获得性免疫反应,在机体特异性免疫过程中会产生记忆细胞,记忆细胞会长期存在于机体内,当机体再次受到相同抗原感染时,会通过记忆细胞的作用快速地反应产生效应细胞,并清除抗原。

2.2.1 B 淋巴细胞 体液免疫是以 B 细胞合成分泌的各类免疫球蛋白与外源性病毒或细菌表面的抗原特异性结合从而降低损伤作用的免疫保护机制^[26]。其中起主要作用的是 IgG、IgM、IgA 这 3 种抗体,在适应状态中 3 类抗体物质含量升高则机体抗感染能力增强,反之则免疫力下降。在兔动脉粥样硬化模型中,李鸿飞等研究茶多酚对动脉粥样硬化斑块中 IgG、IgM 免疫复合物及巨噬细胞等因素的影响,结果表明茶多酚可以抑制 IgG 及巨噬细胞在动脉斑块内的表达,茶多酚可以通过调节作用抑制 IgG 及巨噬细胞在斑块内的表达,并呈现一定的剂量效应^[13]。李永义等利用敌草快诱导仔猪产生氧化应激,研究茶多酚对仔猪生长性能和免疫功能的影响,结果表明茶多酚可以增加仔猪血清 IgG、IgA 和 IgM 的含量^[27]。此外,李忠浩等研究表明茶多酚饲喂蛋鸡后能显著提升产蛋鸡血清 IgG、IgA、IgM 含量^[5]。

2.2.2 T 淋巴细胞 T 细胞免疫是指 T 细胞在接受抗原刺激后产生效应 T 细胞以及记忆细胞,效应 T 细胞特异性结合靶细胞,引起靶细胞破裂死亡的免疫反应。刘晓华等研究发现茶多酚可以显著提高肉仔鸡 T 淋巴细胞转化率^[3]。徐玮等报道,日粮中添加 0.3% 的茶多酚能显著提高幼犬全血 T 淋巴细胞的转化率^[28]。此外,刘军权等报道,一定浓度的茶多酚可以明显提高细胞因子诱导的杀伤细胞 (CIK 细胞) 对肿瘤的杀伤力;经茶多酚处理的人胃癌细胞株 (SGC - 7901

细胞株)更易被 CIK 细胞杀伤,并且茶多酚能诱导 SGC - 7901 死亡和凋亡,对人 CIK 细胞无细胞毒性^[29]。

3 茶多酚对抗氧化系统的影响

3.1 诱导性损伤组织

茶多酚能提高诱导损伤组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px)活性,抑制活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)合成,从而增强组织的脂质抗氧化能力及清除自由基能力。李哲明等研究发现,D - 半乳糖能够造成小鼠体质量及部分脏器指数极显著下降,而且致使小鼠脑和血清中 MDA 含量显著增加,SOD 活性极显著下降^[30];但是茶多酚处理后能够显著提升 D - 半乳糖诱导小鼠的肾脏指数、脾脏指数,而且还能够极显著提高脑和血清中 SOD 活性及降低 MDA 含量,即 EGCG 能够通过增强抗氧化酶活性从而抑制脂质过氧化。冯亮等利用酒精灌胃导致小鼠酒精性肝损伤后经茶多酚治疗后可以显著降低肝 MDA 含量,并且提升肝中 SOD、GSH - Px 活性,从而缓解和减轻酒精灌胃造成的肝损伤作用^[18]。

康伟祥等研究表明,紫外线辐射能够引起雄性小鼠生殖系统损伤,但经过茶多酚治疗后小鼠睾丸组织中 ROS、MDA 含量显著降低,而 SOD、GSH - Px 活性显著升高,表明茶多酚能够清除自由基从而保护机体组织健康,从而明显提升小鼠精子密度及活力^[31]。李桦等研究发现,在肉鸡基础日粮中添加茶多酚后可以极显著提升热应激肉鸡血清中的 SOD 活性,并极显著降低 MDA 含量,从而增强机体抗氧化能力,缓解肉鸡热应激症状^[32]。于淑静等研究发现,雷公藤甲素能够引起小鼠免疫性肝损伤,造成小鼠肝细胞坏死,MDA、IL - 17、IL - 6、Toll 样受体(TLR4)蛋白含量等显著增加,SOD、GSH - P 活性显著降低,但 EGCG 治疗后能够显著降低肝组织中 MDA、IL - 17、IL - 6、TLR4 等含量,并显著增强 SOD、GSH - P 活性,从而减轻免疫性肝损伤,表明 EGCG 可以通过调节机体抗氧化及调节炎症相关因子从而保护肝组织正常功能稳定^[33]。

3.2 正常组织

茶多酚能够提高正常组织中 SOD、GSH - Px 活性从而增强组织抗氧化能力。体内活性氧含量过高会损害免疫细胞,造成机体的免疫力下降。刘振兴等研究发现,166 mg/kg 茶多酚可以提高罗非鱼肌肉中的 SOD 活性^[34]。李金龙研究表明,茶多酚也能显著提高青鱼血清中 SOD 活性,显著降低谷胱甘肽(GSH)含量、GSH - Px 活性、MDA 含量^[14]。洪兴华等研究表明,低水平的茶多酚可以明显增强波尔山羊的 SOD、GSH - Px 活性,并且显著降低波尔山羊血清中 MDA 含量^[35]。孙丹凤研究表明,150 mg/kg 茶多酚可以显著降低肉鸭小肠黏膜中 MDA 含量;100 mg/kg 茶多酚可以显著提高小肠黏膜中 SOD、GSH - Px、二胺氧化酶(DAO)活性^[36]。Li 等对肉仔鸡灌喂不同浓度的茶多酚和乳酸菌,结果表明茶多酚可以影响与改善肉鸡脂质代谢、消化酶活性及炎症反应,其作用机制可能是通过激活 NF - κ B 信号通路^[37]。

4 茶多酚对肠道菌群的影响

动物肠道中寄存有种类繁多、数量庞大的微生物群体,不仅可以发酵食糜为机体提供营养物质,而且还与动物机体的

健康息息相关,肠道微生态平衡被破坏易引发多种疾病,从而影响和阻碍机体的生理机能。

茶多酚能够促进有益菌生长,同时抑制有害菌生长繁殖。张娇蕊等在白羽肉鸡基础日粮中添加绿茶后能够显著增加回肠和盲肠中双歧杆菌和乳酸菌含量,显著抑制回肠中金黄色葡萄球菌和大肠杆菌含量,从而增加肠道有益菌、抑制有害菌生长增殖^[38]。杨阳等利用体外进行粪便样本厌氧发酵并同时进行儿茶素处理,发现儿茶素能够显著增加粪便样本中双歧杆菌和乳酸杆菌等有益菌的数量,但同时会显著降低发酵粪样中的拟杆菌和梭杆菌数量^[39]。此外,刘智伟等研究发现茶多酚具有提高高脂小鼠肠道菌群多样性的作用^[40]。

茶多酚抑菌作用与其浓度密切相关。何水平等研究发现,不同年份的白茶均能抑制金黄色葡萄球菌和福氏志贺氏菌的生长繁殖,但随着白茶年份的增加抑菌效果下降^[41]。刘丹丹等研究发现,不同种类的茶茶叶茶多酚均能抑制大肠杆菌和金黄色葡萄球菌生长,并且随着茶多酚浓度越高抑制作用越强^[42]。辛敏等研究表明,从绿茶、青茶、黄茶、黑茶、红茶和白茶中提取分离的茶多酚能够显著抑制金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌以及蜡样芽孢杆菌生长,并且表明抑菌作用与茶多酚含量密切相关^[43]。许秀秀等研究发现,茶多酚能够有效抑制变形链球菌生长增殖,其最小抑菌浓度(MIC)值为 1.56 mg/mL^[44]。

茶多酚抑菌作用可能与破坏细菌细胞膜结构及抑制致病因子的表达有关。吕娜等在研究安吉白茶对柱状黄杆菌的抑菌作用时发现,茶提取物处理后细菌对磷的消耗量降低,从而影响了细菌核酸、磷脂等重要成分的合成以及能量代谢,引发细菌正常生理功能紊乱,即茶提取物处理后可能破坏了细菌细胞膜结构,导致细胞通透性增加,进而使细胞内容物不断外泄,造成细菌培养液的电导率、可溶性糖含量以及菌悬液中紫外吸收物含量随着处理时间的延长而不断增加^[45]。许颖等研究发现,茶多酚能够有效抑制白色念珠菌的生长繁殖,并且茶多酚浓度越高抑菌作用越强,另外该研究还表明茶多酚能够显著抑制白色念珠菌中 CDR1、CDR2 致病因子的表达,但对 MDR1 无明显抑制作用^[46]。

5 茶多酚对细胞功能稳定的影响及其作用机制

5.1 恶性细胞

茶多酚能够抑制恶性细胞增殖、促进恶性细胞凋亡。汪琳琳等研究表明,EGCG 能够显著促进肝癌 MHCC97L 细胞凋亡,其中凋亡指数以及细胞凋亡率显著提高^[47]。刘亮等研究发现,EGCG 能抑制食管癌 Eca109 细胞端粒酶活性,从而抑制细胞生长以及促进细胞凋亡^[48]。

茶多酚促进恶性细胞凋亡与提高细胞凋亡相关基因及蛋白表达有关。计春燕等研究发现,EGCG 处理胃癌细胞 HGC27 后,能够显著抑制环氧化酶-2(COX - 2)的表达以及前列腺素 E2(PGE2)合成,增加 caspase - 3 和 caspase - 9 活性以及降低线粒体膜电位,从而显著抑制胃癌 HGC27 细胞增殖,同时显著促进胃癌细胞凋亡,所以 EGCG 可以通过抑制 COX - 2 的表达及 PGE2 的合成从而诱导胃癌细胞凋亡^[49]。丁峰等研究发现,EGCG 可以在不同程度上上调 caspase - 3、Bax mRNA 的表达及下调 Bcl - 2 mRNA 的表达,从而诱导裸鼠

MGC-803 细胞移植瘤细胞凋亡^[50]。

茶多酚促进恶性细胞凋亡与激活 PTEN-PI3K/AKT 信号通路有关。李丽丽等研究表明,EGCG 处理皮肤鳞状细胞癌(SCL-1)细胞后,能够显著抑制 SCL-1 细胞增殖,显著增加细胞同源性磷酸酶-张力蛋白(PTEN)的表达量,同时显著降低磷酸化蛋白激酶(p-AKT)、增殖细胞核抗原(PCNA)表达量,即 EGCG 能够激活 PTEN-PI3K/AKT 信号通路从而抑制 SCL-1 细胞增殖^[51]。

茶多酚促进细胞凋亡与阻断细胞周期相关。李杰等研究发现,EGCG 处理宫颈腺癌 HeLa 细胞后细胞凋亡率明显上升,而且能够造成细胞周期阻断在 G0/G1 期,S 期所占比例明显下降,从而抑制宫颈腺癌 HeLa 细胞增殖停滞并最终诱导细胞凋亡^[52]。尚泽森等研究发现,EGCG 处理人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞后细胞周期停滞,而且可以抑制细胞迁移,从而造成乳腺癌细胞死亡率上升、存活率下降^[53]。

茶多酚促进恶性细胞凋亡与 p16 基因去甲基化有关。王永连等研究表明,EGCG 处理人食管癌 Eca109 细胞后能够显著降低 Eca109 细胞存活率,显著促进细胞凋亡,而且还能够激活 p16 基因去甲基化,增加 p16 mRNA 和蛋白的表达,并且作用效果呈现剂量效应,表明 EGCG 能够调控基因甲基化,从而调节基因表达的变化,抑制恶性细胞生长增殖^[54]。

5.2 外源性损伤细胞

茶多酚能够抑制细胞外源性损伤及细胞凋亡,提升细胞活力并促进细胞增殖。林勇等研究发现,紫外线光损伤能够造成人表皮角质形成细胞(HaCaT)活性显著降低,但经过茶多酚处理后可以显著提高细胞存活率,达到 5.89%^[55]。

茶多酚能够抑制细胞外源性损伤诱导的凋亡相关基因及蛋白的表达。杨哲等研究表明,EGCG 处理后能显著抑制过氧化氢(H₂O₂)诱导的人晶状体上皮细胞(human lens epithelial, HLE)细胞凋亡,明显提高 HLE 细胞活力,并且明显减少细胞内 caspases-3、caspases-9 的表达,从而有效抑制了 H₂O₂ 对细胞造成的诱导性氧化损伤^[56]。有研究已经表明,脂多糖能够诱导人牙周膜成纤维细胞 HPDLFs MMP-1、MMP2 分泌量以及基因过表达诱导胶原降解,而且还能促进 HPDLFs 细胞凋亡及引起 TNF-α、IL-6 等炎症因子高表达,但是经茶多酚治疗后可以显著抑制 MMP-1、MMP-2 及 TNF-α、IL-6 等炎症因子表达,以及有效抑制 HPDLFs 细胞凋亡,从而缓解和对抗脂多糖对 HPDLFs 造成的损伤作用^[57-58]。日本血吸虫能够诱导小鼠肝体指数升高,肝脏虫卵肉芽肿形成、胶原沉积、肝纤维化等症状,而袁发祥等研究表明 EGCG 处理后,能够抑制日本血吸虫感染小鼠肝组织中金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)和 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的分泌,从而抑制肝星状细胞(HSC)活化,减少胶原在肝组织中沉积,减轻肝组织病变症状^[59]。

茶多酚能够抑制细胞外源性损伤诱导的炎症相关因子的表达。王馨等研究表明,脂多糖造成神经胶质细胞 TNF-α、IL-1β、IL-8 等炎症因子水平显著上升,iNOS 蛋白表达量显著提高,但 EGCG 处理后能够抑制炎症因子的过度产生,在一定程度上能减轻脂多糖诱导原代神经胶质细胞的炎症反应^[60]。陈华等研究表明,脂多糖能够诱导胶质细胞炎症相关因子过表达,但是 EGCG 治疗后能够抑制 TNF-α、IL-1β、

IL-8、iNOS 等含量上升,从而抑制脂多糖对胶质细胞的毒性损伤作用^[61]。

茶多酚能够抑制细胞外源性损伤诱导的 ROS 的表达量,并增强细胞抗氧化能力。刘华等研究表明,IL-1β 能够诱导 MIN6 细胞活性降低、细胞凋亡明显增加、细胞线粒体膜电位降低、ROS 活性增加,但 EGCG 处理后会减轻 IL-1β 诱导的 MIN6 细胞凋亡率,ROS 活性降低,细胞活性明显提高^[62]。林勇等研究发现,紫外线光损伤能够造成人表皮角质形成细胞(HaCaT)活性显著降低,但经过茶多酚处理后可以显著降低细胞中 ROS、MDA 含量,并极显著增加细胞中 SOD、GSH-Px 活性,从而增强清除自由基能力,并最终明显提高细胞存活率,达到 5.89%^[55]。

6 存在的问题及展望

综上所述,茶多酚可以通过调节免疫器官的生长发育、特异性免疫系统、非特异性免疫系统、抗氧化系统以及肠道微生态平衡的变化从而影响动物健康,而且目前茶多酚对动物机体健康的保护作用的研究主要是在基于诱导动物组织或细胞外源性损伤作用的情况下研究茶多酚对损伤的调节恢复机制;但目前所采用的方法大都属于对免疫相关因素选定性的定量分析检测的研究方法,缺少深入全面性的研究;另外研究对象比较单一,多以小鼠/大鼠为主,这主要是基于人药理学研究需要,对经济动物(畜禽)健康的综合调控作用则更为鲜见,在畜禽养殖中抗生素残留严重、食品安全频发的情况下,研究茶对经济动物健康的促进保护作用显得十分重要。

参考文献:

- [1] 初晓,姚如泳,韩志武. 茶多酚对 D-半乳糖致衰老小鼠免疫功能调节作用[J]. 中国医院药学杂志,2006,26(5):637-638.
- [2] 刘淑红,李堃,王美,等. 茶多酚对 Lewis 肺癌的生长抑制、抗氧化及免疫调节作用的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2003,10(3):206-209.
- [3] 刘晓华,邵卫华,陈喜斌,等. 茶多酚对肉仔鸡(公鸡)脂类代谢和免疫机能的影响[J]. 粮食与饲料工业,2003(11):31-33.
- [4] 刘德义,陈会良,王逢,等. 茶多酚对固始鸡免疫器官发育的影响[J]. 中国饲料,2008(2):26-27.
- [5] 李忠浩,王丽. 茶多酚对产蛋鸡免疫性能的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2013(24):106-106.
- [6] 易先国. 茶多酚对固始鸡雏鸡生长发育的影响[J]. 动物医学进展,2014(10):43-46.
- [7] 徐奇友,李婵,许红,等. 茶多酚对虹鳟生长性能、生化指标和非特异性免疫指标的影响[J]. 动物营养学报,2008,20(5):547-553.
- [8] 田志刚,陈永艳. NK 细胞的发育、分化与识别机制[J]. 中国免疫学杂志,2009,25(1):31-34.
- [9] 崔英,梁新强,岳惠芬,等. 茶多酚对肝癌高危人群 T 淋巴细胞亚群和 NK 细胞活性的影响[J]. 肿瘤防治杂志,2005,12(2):92-94.
- [10] 潘喜华,杨隽,郑勇英,等. 茶多酚调节免疫、抑制肿瘤及抗衰老作用的研究[J]. 上海预防医学,2000(2):58-60.
- [11] 郭春宏,李正翔. 茶多酚免疫药理作用研究[J]. 天津医科大学学报,2009,15(1):102-104.

- [12] 李 振,陈现伟. 茶多酚的免疫调节作用及应用[J]. 中国兽药杂志,2004,38(4):33-35.
- [13] 李鸿飞. 兔动脉粥样硬化斑块发生发展的免疫机制及茶多酚防治作用的初步研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2009.
- [14] 李金龙. 茶多酚对青鱼幼鱼生长、免疫及脂肪代谢的影响[D]. 长沙:湖南农业大学,2013.
- [15] 许发明,许爱娥,吴纪龙,等. 茶多酚对白癜风患者 CD8⁺ T 淋巴细胞分泌肿瘤坏死因子 α 、干扰素 γ 和白介素 2 受体影响[J]. 中华皮肤科杂志,2013,46(6):411-414.
- [16] 区锦莹,温嘉莉,刁建新,等. 绿茶提取物对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床,2015(5):88-92.
- [17] 刘冬梅,张 晶,王晓非. EGCG 对 ConA 诱导的肝损伤小鼠 TNF- α 与 IL-17 表达的影响[J]. 解剖科学进展,2014(3):229-232.
- [18] 冯 亮,汪 燕,潘小玲,等. 茶多酚对酒精性肝损伤大鼠的抗炎抗氧化保护作用[J]. 中国药业,2015(22):37-39.
- [19] 徐丽倩,李 江,李璐璐,等. 茶多酚和黄芩苷对百草枯中毒大鼠血清及肺组织 TGF- β 1 和 HIF-1 α 表达的影响[J]. 浙江中西医结合杂志,2014(9):757-760.
- [20] Shetty S, Lalor P F, Adams D H. Lymphocyte recruitment to the liver: molecular insights into the pathogenesis of liver injury and hepatitis[J]. Toxicology,2008,254(3):136-146.
- [21] 刘冬梅,张 晶,孙 玥. EGCG 对刀豆蛋白 A 诱导肝损伤小鼠 CXCR3 表达的影响[J]. 中国老年学,2015,35(7):1919-1921.
- [22] 孙 冰,韩代书. Toll 样受体信号通路的负调控[J]. 生物化学与生物物理进展,2009,36(12):1516-1522.
- [23] 刘冬梅,王晓非. 表没食子儿茶素没食子酸酯对 ConA 诱导的肝损伤小鼠 Toll 受体表达的影响[J]. 解剖学研究,2014(3):176-179.
- [24] 范 骏,谢 勇. 肠道黏膜免疫[J]. 国际免疫学杂志,2006,29(2):111-115.
- [25] 李玲秀. 茶多酚与茶皂素对隐性感染球虫的肉鸡生长、免疫力及抗氧化性能的影响[D]. 合肥:安徽农业大学,2014.
- [26] 王明圣,徐学富,周红彬,等. 缺铁性贫血小儿免疫球蛋白和 T 淋巴细胞亚群的变化[J]. 中华血液学杂志,1995(5):260-261.
- [27] 李永义,段绪东,赵 娇,等. 茶多酚对氧化应激仔猪生长性能和免疫功能的影响[J]. 中国畜牧杂志,2011,47(15):53-57.
- [28] 徐 玮,王利华,聂 宁. 茶多酚对幼犬淋巴细胞转化率的影响[J]. 饲料工业,2009(1):58-59.
- [29] 刘军权,陈复兴,巩新建,等. 茶多酚增强 T 淋巴细胞杀伤肿瘤细胞的作用研究[J]. 陕西医学杂志,2003,32(4):355-357.
- [30] 李哲明,何嘉娜,刘 琼,等. 安吉白茶茶多酚对 D-半乳糖致衰老模型小鼠的抗氧化作用研究[J]. 贵阳中医学院学报,2016,38(2):21-24.
- [31] 康伟祥,王振宇,陈 思,等. 茶多酚干预紫外线辐射致雄性小鼠生殖系统损伤的实验研究[J]. 湘南学院学报(医学版),2015,17(1):7-9.
- [32] 李 桦,杨梅梅,屈 倩,等. 绿茶多酚对热应激肉鸡血生化指标和抗氧化能力的影响[J]. 中国兽医学报,2016,36(5):801-803.
- [33] 于淑静,周莲娜,魏彩冰,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对免疫性肝损伤的保护作用及其机制研究[J]. 中国免疫学杂志,2016,32(10):1458-1461.
- [34] 刘振兴,柯 浩,郝 乐,等. 茶多酚对罗非鱼生长性能、抗氧化功能和非特异性免疫指标的影响[J]. 广东农业科学,2012,39(23):113-115.
- [35] 洪兴华,孟 慧,孙长勉,等. 日粮中添加茶多酚对山羊抗氧化性能的影响[J]. 中国畜牧杂志,2009,45(21):29-31.
- [36] 孙丹凤. 三种抗氧化剂的不同水平组合对肉鸭肠道组织结构和功能的影响[D]. 武汉:武汉工业学院,2010.
- [37] Li H, Li Z J, Wei Z S, 等. 茶多酚和乳酸菌影响肉鸡血液生化、消化酶以及肠道细胞因子表达的研究[J]. 浙江大学学报(B 卷英文版),2015,16(12):1019-1026.
- [38] 张娇蕊,周裔彬,耿照玉. 日粮中添加绿茶粉对白羽肉鸡肠道菌群的影响[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2015,35(4):426-429.
- [39] 杨 阳,张 鑫,翁佩芳,等. 茶叶儿茶素的益生元活性研究[J]. 现代食品科技,2015(4):128-136.
- [40] 刘智伟,曾本华,张晓婧,等. 茶多酚饮食对 HFA 小鼠肠道菌群和脂肪代谢的影响[J]. 中国食品学报,2015,15(6):26-31.
- [41] 何水平,李晓静,罗碧玉,等. 不同年份白茶抑菌效果研究[J]. 食品工业科技,2016,37(14):164-168.
- [42] 刘丹丹,曹雪姣,刘祖洋,等. 不同种类茶叶茶多酚对细菌生长的抑制作用[J]. 中国科技信息,2014(6):152-154.
- [43] 辛 敏,詹 欣,刘 轩,等. 6 种茶类多酚含量测定及其抑菌活性[J]. 食品与药品,2014,16(3):181-184.
- [44] 许秀秀,王志群,杨清岭,等. 茶多酚-柠檬提取物混合液对变形链球菌生长与黏附影响的研究[J]. 中国微生态学杂志,2016,28(4):409-412.
- [45] 吕 娜,韦 薇,顾 帅,等. 安吉白茶对柱状杆菌抑菌机理的研究[J]. 中国畜牧兽医,2015,42(1):136-139.
- [46] 许 颖,王本材,袁雪明,等. 茶多酚对白色念珠菌致病因子 CDR1、CDR2、MDR1 的研究[J]. 中国微生态学杂志,2015,27(8):910-912.
- [47] 汪琳琳,赵大鹏,吴乐乐,等. EGCG 诱导人肝癌 MHCC97L 细胞凋亡的相关研究[J]. 生物技术世界,2014(8):102.
- [48] 刘 亮,左 静,李金丫,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对食管癌细胞生长的抑制作用及机制研究[J]. 解放军医学杂志,2014,39(9):709-713.
- [49] 计春燕,谭诗云,李 明. EGCG 通过抑制 COX-2 表达及 PGE2 合成诱导胃癌细胞系 HGC27 凋亡[J]. 辽宁中医药大学学报,2015(4):25-28.
- [50] 丁 峰,刘学政,李 娟. 表没食子儿茶素没食子酸酯对裸鼠 MGC-803 细胞移植瘤抑制作用及机制研究[J]. 中药药理与临床,2016(3):33-37.
- [51] 李丽丽,陈显峰,黄琦涛,等. EGCG 通过 PTEN-PI3K/AKT 途径抑制 SCL-1 细胞增殖及其机制的研究[J]. 中国临床新医学,2016,9(7):584-587.
- [52] 李 杰. 表没食子儿茶素没食子酸酯联合视黄酸对宫颈腺癌细胞的抗增殖作用研究[J]. 中国实验诊断学,2015(4):547-551.
- [53] 尚泽森,黄杨佩韦,马丽清. 表没食子儿茶素没食子酸酯抑制乳腺癌细胞增殖和迁移[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2015,31(2):207-212.
- [54] 王永连,白 玉,王忠民. EGCG 对人食管癌 Eca109 细胞生长凋亡及其 p16 基因甲基化状态、mRNA 和蛋白表达水平的影响[J]. 广东医学,2016,37(10):1437-1441.
- [55] 林 勇,刘仲华,马 蕊. 茶叶中表没食子儿茶素没食子酸酯抑制中波紫外线诱导 HaCaT 细胞氧化损伤研究[J]. 食品安全质量检测学报,2015(4):1224-1228.

李莉梅, 欧阳乐军, 尹爱国, 等. 1 种大片段敲除巨桉细胞分裂素氧化酶基因的 CRISPR 载体构建[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(12): 19–22.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.12.004

1 种大片段敲除巨桉细胞分裂素氧化酶基因的 CRISPR 载体构建

李莉梅, 欧阳乐军, 尹爱国, 韩寒冰, 陈凯钊, 布良灏, 孙同川

(广东石油化工学院, 广东茂名 525000)

摘要: CRISPR–Cas 系统是细菌和古细菌在进化过程中逐渐形成的一种适应性免疫系统, 通过 sgRNA 介导对靶位点进行定位并利用 Cas 酶对核酸实现双链断裂。CRISPR–Cas9 系统以其操作简单、效率高等优点被迅速应用到对原核生物和真核生物的基因编辑当中。以巨桉 CKX 基因为目的基因, 构建 CRISPR–35S–Cas9 植物基因编辑系统大片段敲除巨桉 CKX 基因的表达载体, 重组质粒的 PCR 鉴定及测序结果表明, 含 2 个 Target 的重组载体构建成功。研究结果为 CRISPR/Cas9 系统在桉树功能基因研究及育种中的应用奠定基础。

关键词: CRISPR/Cas9; 基因敲除; 桉树; CKX 基因; 载体构建

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2018)12–0019–04

CRISPR/Cas9 基因组定向编辑技术是近几年发展起来的对基因组进行定向精确修饰的一种技术。通过将外源 DNA 导入受体细胞染色体的特定位点上, 从而特异地改造基因组, 研究基因的功能。该技术可以对基因组中的靶位点进行缺失、敲入、核苷酸修正等操作。2013 年, 科学家首次将 CRISPR/Cas9 应用到人类和小鼠细胞系中对基因进行敲除^[1], 随后人们在模式植物和其他农作物中也成功获得了应用, 经过改造的 CRISPR/Cas9 系统也迅速地被应用到拟南芥、烟草、高粱、水稻、小麦、玉米等不同植物基因组的定向编辑研究中, 并且获得较高的诱导突变率和可稳定遗传的基因组编辑植株^[2–3]。相对于转基因技术, CRISPR/Cas9 系统具有操作简单、快捷、不需要巨大的资金投入、在遗传编辑之后

不留下转基因的痕迹等优点, 无需引用外源基因, 因而生物安全性高, 不具有转基因争议。

目前, CRISPR/Cas9 系统在植物中的应用存在表达活性不高以及单位点基因编辑后代的酶切检测繁琐等问题^[4]。要想设计高效率的 CRISPR/Cas9 系统, 要考虑到该系统表达的时间、空间以及效率等几个方面。目前多数 CRISPR 载体都只有 1 个 sgRNA, 只能靶向基因的 1 个位点, 有时基因突变的效率并不高, 这是因为预测 sgRNA 效率的体系和方法还不是很完善。多个 sgRNA 能够靶向同一基因的不同位点, 提高基因突变的频率; 也能造成较大片段的缺失突变, 也利于突变后代的 PCR 方法筛选检测。另外, 多个 sgRNA 也能靶向不同的基因, 特别是同一信号通路、同一代谢途径或同一基因家族的基因, 在基础生命科学研究中具有重要的应用价值。本研究以细胞分裂素氧化/脱氢酶基因 (cytokinin oxidase/dehydrogenase, CKX) 为目标基因, 以 PHDE–35S–Cas9 为基础载体, 通过 3 轮 PCR 反应, 建立将 2 个 sgRNA 串联到同一个 CRISPR 载体中的方法体系, 可同时连接 2 个 target 片段, 突变效率高, 突变后代鉴定简单, 无须进行酶切鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

细菌培养基 (LB) 的制备: 酵母提取粉 5 g, 蛋白胨 10 g,

化学杂志, 2016(5): 428–433.

[60] 王 馨, 严 磊, 苗加伟, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对脂多糖诱导原代胶质细胞炎症反应的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(10): 917–920.

[61] 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, 2016, 36(16): 3913–3914.

[62] 刘 华, 曹第勇, 杨尚君, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对 IL–1 β 诱导 MIN6 细胞凋亡的保护作用[J]. 重庆医学, 2015(23): 3183–3186.

收稿日期: 2017–08–03

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31470677); 广东省自然科学基金 (编号: 2015A030313560, 2017A030307017); 广东省“扬帆计划”高层次人才项目 (编号: 201434023); 广东省科技计划 (编号: 2017A030303087); 广东省大学生攀登计划 (编号: pdjhb0343, pdjhb0338)。

作者简介: 李莉梅 (1980—), 河南沈丘人, 硕士, 实验师, 研究方向为植物分生物学。E–mail: lilimeinh@163.com。

通信作者: 欧阳乐军, 博士, 副教授, 研究方向为植物基因工程。E–mail: ouyanglejun@163.com。

[56] 杨 哲, 刘 平, 王嘉翔, 等. EGCG 对 H₂O₂ 诱导 HLE 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(28): 5410–5427.

[57] 李小娜, 范 芹, 黄伟琨, 等. 茶多酚对脂多糖介导下人牙周膜成纤维细胞 MMP–1、MMP–2 表达的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2014(6): 774–777.

[58] 王 珏, 欧 龙, 罗 芸, 等. 茶多酚对脂多糖诱导人牙周膜成纤维细胞凋亡及炎症因子的影响[J]. 中华老年口腔医学杂志, 2015(2): 80–84.

[59] 袁发许, 冯金梅, 刘 锴, 等. EGCG 对日本血吸虫感染小鼠 TIMP–1 及 α –SMA 表达和肝纤维化的影响[J]. 中国病原体