

肌肽对离体培养的鸡肝细胞的影响

李文清 刘 丽*

(华南农业大学动物科学学院 广州 510642)

摘要:研究了肌肽对离体培养的鸡肝细胞的影响。实验采用胶原酶原位二步灌注法获得鸡肝细胞,再用不同浓度的肌肽(① 2 $\mu\text{mol/L}$ 、② 20 $\mu\text{mol/L}$ 、③ 200 $\mu\text{mol/L}$ 、④ 20 mmol/L)分别进行处理。结果表明,1)在各个时期,含 20 $\mu\text{mol/L}$ 肌肽的实验组肝细胞生长均好于对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 肌肽),而且在 48 和 72 h 时二者差异显著($P < 0.05$);2)20 mmol/L 肌肽能显著提高肝细胞的分泌白蛋白的功能($P < 0.05$);3)添加肌肽的各实验组上清液中丙二醛(MDA)含量在 24 和 48 h 时均低于对照组;4)添加 20 mmol/L 肌肽的实验组与对照组相比,能维持无血清培养肝细胞的形态达 8 d。表明了肌肽对鸡肝细胞增殖和分泌白蛋白有促进作用,同时可以保护肝细胞对抗过氧化,保护细胞形态。

关键词:肌肽,鸡肝细胞,离体培养,增殖,分泌

中图分类号:Q343.6 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2005)03-90-05

The Effect of Carnosine on the Chicken Hepatocytes *in Vitro*

LI Wen-Qing LIU Li

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The effect of carnosine on the chicken hepatocytes in culture was studied. The chicken hepatocytes were obtained by two steps *in situ* circulator perfusion method. The cell proliferation, the secretion of the albumin, and the level of the maleic dialdehyde (MDA) were determined after the addition of carnosine (0 $\mu\text{mol/L}$, 2 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 200 $\mu\text{mol/L}$ or 20 mmol/L) into the culture medium. The hepatocytes cultured with 20 $\mu\text{mol/L}$ carnosine proliferated better than that of control group, especially at 48 h and 72 h ($P < 0.05$). The ability of secreting albumin (ALB) by the hepatocytes was significantly increased by 20 mmol/L carnosine. Carnosine in different doses decreased the levels of MDA. Moreover, 20 mmol/L carnosine could keep the hepatocytes in the serum-free culture survive for more than 8 days. It could be concluded that carnosine could promote chicken hepatocyte proliferation and ALB secretion, and protect hepatocytes from peroxidation.

Key words: Carnosine; Chicken hepatocytes; *In vitro* Proliferation; Secretion

肌肽(carnosine)是由丙氨酸和组氨酸组成的二肽,最初发现于哺乳类和鸟类的肌肉中,后来在许多脊椎动物包括人类的肌肉和脑中也发现了肌肽的存在^[1]。据 Boldyrev^[2]报道,肌肽能与脂类的过氧化产物、超氧化阴离子自由基以及羟自由基直接作用,对细胞膜具有保护作用。Hipkiss^[3,4]等报道肌肽能与低分子量的醛、酮化合物反应,从而保护细胞膜结构不受醛的损害。目前发现肌肽的作用主要在以下几个方面:抗

氧化性和对细胞膜的保护作用;对肌成纤维细胞的抗衰老和幼化作用;对金属的螯合作用。肌肽对离体培养的鸡肝细胞的影响国内外未见报道,而肝脏是动物机体的重要代谢器官,机体

基金项目 国家自然科学基金(No.30170692);

* 通讯作者, E-mail: liuli@scau.edu.cn;

第一作者介绍 李文清,女,硕士,研究方向 动物生理生化;

E-mail: aabb27@sohu.com.

收稿日期 2004-08-16, 修回日期 2005-03-24

正常的生长发育与物质代谢均与肝细胞的功能有关,因此研究肌肽对离体培养的鸡肝细胞的影响具有重要的意义,本文就此作了初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 原位二步灌流法分离鸡肝细胞 按照 Seglen^[5]的两步灌流法并进行了改进:选取 16 d 健康粤黄鸡苗破坏脑髓,打开腹腔,先用预热 37℃ 的 PBS 液对小鸡进行门静脉快速灌流,当肝脏呈现苍白略带黄色时,改用预热 37℃ 0.05% IV 型胶原酶溶液继续灌流,直至肝包膜与肝组织出现裂隙,可得到大量活性高且分离较纯的肝细胞,用原位二步灌流法获得细胞后,可以按 3×10^5 个细胞/ml 的密度接种于不同的培养板,如果在显微镜下观察到的肝细胞不纯,可以在细胞接种贴壁 12 h 后全量换液,就可以除去那些悬浮的、不贴壁的红细胞和小组织屑等杂质,然后进行分组处理。

1.2 分组、处理和指标测定 分别用含不同浓度肌肽(① 2 $\mu\text{mol/L}$ ② 20 $\mu\text{mol/L}$ ③ 200 $\mu\text{mol/L}$ ④ 20 mmol/L)的完全培养液处理肝细胞,以不含肌肽的完全培养液(0 $\mu\text{mol/L}$ 肌肽)为对照组。用四唑盐比色法即 MTT 法检测上述不同浓度肌肽对体外无血清培养的鸡肝细胞增殖的影响,检测细胞增殖一般都用无血清培养。四唑盐比色法的原理是活细胞中脱氢酶能将四唑盐还原成不溶于水的蓝色产物甲臜,并沉淀在细胞中,而死细胞没有这种功能,二甲亚砜能溶解沉积在细胞中蓝紫色结晶物,溶液颜色的深浅与所含的甲臜量成正比,再用酶标仪测定 OD 值^[1],即可表示细胞的增殖结果。

根据增殖实验的结果选取 20 $\mu\text{mol/L}$ 剂量进行下一步生长曲线的测定^[1],生长曲线的测定实际上就是检测不同时间内细胞的增殖情况,因为培养的时间较长,我们选用了有血清培养以保证细胞能较长时间的存活。测定方法是分别在 24、48、72、96 及 120 h 时取样,用 MTT 法检测 20 $\mu\text{mol/L}$ 肌肽组和对照组的增殖情况。

在 48 h 时取样,用溴甲酚绿法检测各组分

泌白蛋白的能力(按照南京建成生物工程公司的试剂盒说明进行),测试原理是:白蛋白具有与阴离子染料结合的特性,在 pH 4.0 左右溴甲酚绿与白蛋白结合后,由黄色变成绿色,绿色的深浅与白蛋白浓度成正比,在 628 nm 下,通过比色法再与标准溶液(试剂盒内有已知浓度的标液)进行比较就可得出白蛋白含量。

在 24、48 h 时取样测各组丙二醛(MDA)含量(按照南京建成生物工程公司的试剂盒说明进行)。测试原理是:过氧化脂质降解产物中的丙二醛可与硫代巴比妥酸缩合,形成红色产物,在 532 nm 处有最大吸收峰,而测试 MDA 的量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损伤的程度。

根据 McFarland^[6,7]的研究,肌肽在体内的生理浓度是 30 mmol/L,所以实验选择与其浓度最接近的 20 mmol/L 剂量组,观察与对照组相比较细胞形态的变化。

1.3 数据统计与处理 数据由 SAS 8.0 统计处理软件进行方差分析和 DUNCAN 氏多重比较。实验数据采用平均值 \pm 标准误表示。

2 结果与分析

2.1 鸡肝细胞的分离和培养 采用原位二步灌流法可以得到大量活性高且分离较纯的肝细胞,台盼蓝检测细胞达到 95%(图版 I:1)。

2.2 肌肽对鸡肝细胞增殖的影响 表 1 显示,在无血清培养条件下,不同浓度的肌肽除了 20 $\mu\text{mol/L}$ 这个浓度外,其他剂量组增殖反而不如对照组显著($P < 0.05$)。

表 1 不同浓度肌肽对体外无血清培养的鸡肝细胞增殖的影响($n = 12$)

分组	肌肽浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	对照组(OD)	肌肽组(OD)
对照组	0	0.0516 \pm 0.0010 ^a	
①	2		0.0461 \pm 0.0010 ^b
②	20		0.0531 \pm 0.0007 ^a
③	200		0.0433 \pm 0.0012 ^b
④	20 \times 10 ³		0.0477 \pm 0.0012 ^b

不同字母表示差异显著,相同字母表示差异不显著

表 2 显示,在各个时期,含 20 $\mu\text{mol/L}$ 肌肽

的实验组肝细胞生长均好于对照组,而且在 48 和 72 h 时差异显著 ($P < 0.05$)。20 $\mu\text{mol/L}$ 肌肽组和对照组细胞在 24 h 的形态分别见图版 I: 2、3。

表 2 20 $\mu\text{mol/L}$ 肌肽对体外不同时间有血清培养的鸡肝细胞增殖的影响 ($n = 12$)

时间(h)	对照组(OD)	20 $\mu\text{mol/L}$ 肌肽组(OD)
24	0.044 5 \pm 0.001 7 ^a	0.047 3 \pm 0.001 7 ^a
48	0.067 3 \pm 0.001 0 ^b	0.088 8 \pm 0.001 7 ^a
72	0.054 7 \pm 0.000 7 ^b	0.088 3 \pm 0.003 3 ^a
96	0.049 5 \pm 0.002 3 ^a	0.050 4 \pm 0.002 9 ^a
120	0.054 1 \pm 0.002 1 ^a	0.058 5 \pm 0.004 5 ^a

不同字母表示差异显著 相同字母表示差异不显著

2.3 肌肽对鸡肝细胞上清液中 MDA 含量的影响 由表 3 可知,24 h 时各组之间 MDA 值差异不显著 ($P > 0.05$),但是肌肽添加组 MDA 值都低于对照组,且呈现剂量依赖性的变化。说明添加肌肽 24 h 后脂质过氧化产物较低,并随着剂量的增加抗氧化作用加强。48 h 时各组之间 MDA 值差异仍不显著 ($P > 0.05$),但各实验组基本上都低于对照组,说明添加肌肽 48 h 后仍然对肝细胞有较好的抗脂质氧化作用。且 48 h 上清液中的 MDA 值明显大于 24 h,说明随着时间的延长丙二醛产物增多,脂质过氧化程度加深。

表 3 肌肽对 24 h 和 48 h 细胞上清液中 MDA 值的影响

分组	肌肽浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	MDA (nmol/mg prot.)	
		24 h	48 h
对照组	0	2.449 4 \pm 0.104 7	3.881 8 \pm 0.260 4
①	2	1.993 8 \pm 0.151 0	3.378 0 \pm 0.355 4
②	20	1.993 8 \pm 0.127 4	3.831 4 \pm 0.905 7
③	200	1.665 0 \pm 0.892 7	2.809 5 \pm 0.358 3
④	20 \times 10 ³	1.650 3 \pm 0.336 7	2.744 2 \pm 0.360 9

2.4 肌肽对白蛋白分泌的影响 由表 4 可知,添加 20 mmol/L 肌肽对肝细胞合成白蛋白有显著的促进作用 ($P < 0.05$),而其他各剂量添加的肌肽对肝细胞合成白蛋白无显著的促进作用,但是随着添加量的增加,培养的肝细胞白蛋

白分泌量也逐渐增加,并且都高于对照组。

表 4 肌肽对肝细胞白蛋白分泌水平的影响 ($n = 6$)

分组	肌肽浓度($\mu\text{mol/L}$)	白蛋白 (mg/ml)
对照组	0	0.066 2 \pm 0.012 3 ^b
①	2	0.076 4 \pm 0.010 4 ^b
②	20	0.081 5 \pm 0.006 5 ^b
③	200	0.081 5 \pm 0.010 2 ^b
④	20 \times 10 ³	0.168 1 \pm 0.031 3 ^a

不同字母表示差异显著 相同字母表示差异不显著

2.5 20 mmol/L 肌肽对无血清培养的肝细胞形态的影响 20 mmol/L 肌肽与对照组相比能维持无血清培养肝细胞的形态达 8 d (图版 I: 4) 表明 20 mmol/L 肌肽能极好的保护细胞形态不发生改变。无血清对照组肝细胞在第 4 d (图版 I: 5) 就出现漂浮、不贴壁现象,表明细胞已经死亡。

3 讨论

研究表明,许多低分子量的短肽对细胞增殖有促进作用。如 Azuma 等^[8]报道,人乳 β -酪蛋白经酶解后产生的多肽对小鼠胚胎成纤维细胞有促增殖作用。

无血清培养条件下各剂量组肌肽对鸡肝细胞的增殖无太大作用,个别组还显著低于对照组,与 Mcfarland 和 Holliday^[9]报道的 L-肌肽对培养二倍体人成纤维细胞的生长、形态和寿命有利不太相符。可能的原因是肌肽是一种显碱性的二肽,而鸡肝细胞是一种较为脆弱和敏感的细胞,而成纤维细胞是一种很容易贴壁的细胞,所以无血清条件下肌肽对肝细胞增殖发挥不了促进作用。而试探性地选择一种剂量,即 20 $\mu\text{mol/L}$ 肌肽进行有血清培养。结果发现,20 $\mu\text{mol/L}$ 肌肽处理组细胞的 OD 值在 24 和 72 h 都显著高于对照组,而且其后的生长趋势也一直优于对照组,提示了肌肽有利于鸡肝细胞增殖,但具有剂量选择性和培养条件的选择性。

24 和 48 h 分别检测上清液中的 MDA 值,在 24 h,各剂量肌肽组其 MDA 值都低于对照组,且到了 48 h 仍然能维持各剂量添加组的抗氧化能力高于对照组,间接反应出实验组细胞

受氧化损伤的程度比对照组轻,表明肌肽具有一定的抗氧化作用。

白蛋白(ALB)是反映肝细胞活性和功能良好的指标之一,肝细胞的成熟会使 ALB 合成增多,而细胞的活力下降会使 ALB 合成减少。本实验发现各实验组细胞上清液中 ALB 的分泌量均高于对照组。2 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 和 200 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组与对照组相比,分泌量虽然没有产生显著性的差异,但是都比对照组高;而 20 mmol/L 肌肽组的 ALB 分泌量显著高于对照组 ($P < 0.05$),表明肌肽对肝细胞合成白蛋白有利。

同时,对鸡肝细胞进行无血清培养,观察 20 mmol/L 肌肽对无血清培养的肝细胞形态的影响,结果发现 20 mmol/L 肌肽能极好的保护细胞形态不发生改变,而对照组第 4 d 就出现漂浮。日本学者 Sachi Sri Kantha^[10]报道成纤维细胞培养中,30 mmol/L 肌肽能维持营养缺乏的细胞形态达 5 周,与我们的结果有相似之处,20 mmol/L 肌肽能维持无血清培养的鸡肝细胞生长达 8 d 之久,显示 20 mmol/L 肌肽在营养缺乏的条件下能很好的维持细胞形态不发生改变。

以上结果提示,适宜剂量的肌肽对离体培养的鸡肝细胞增殖活性、白蛋白的分泌、抗氧化能力及细胞形态的维持均有一定的促进作用,这可能是因为肌肽能够解除培养环境有毒物质对细胞的毒害作用,有利于肝细胞的存活及功

能的维持。

参 考 文 献

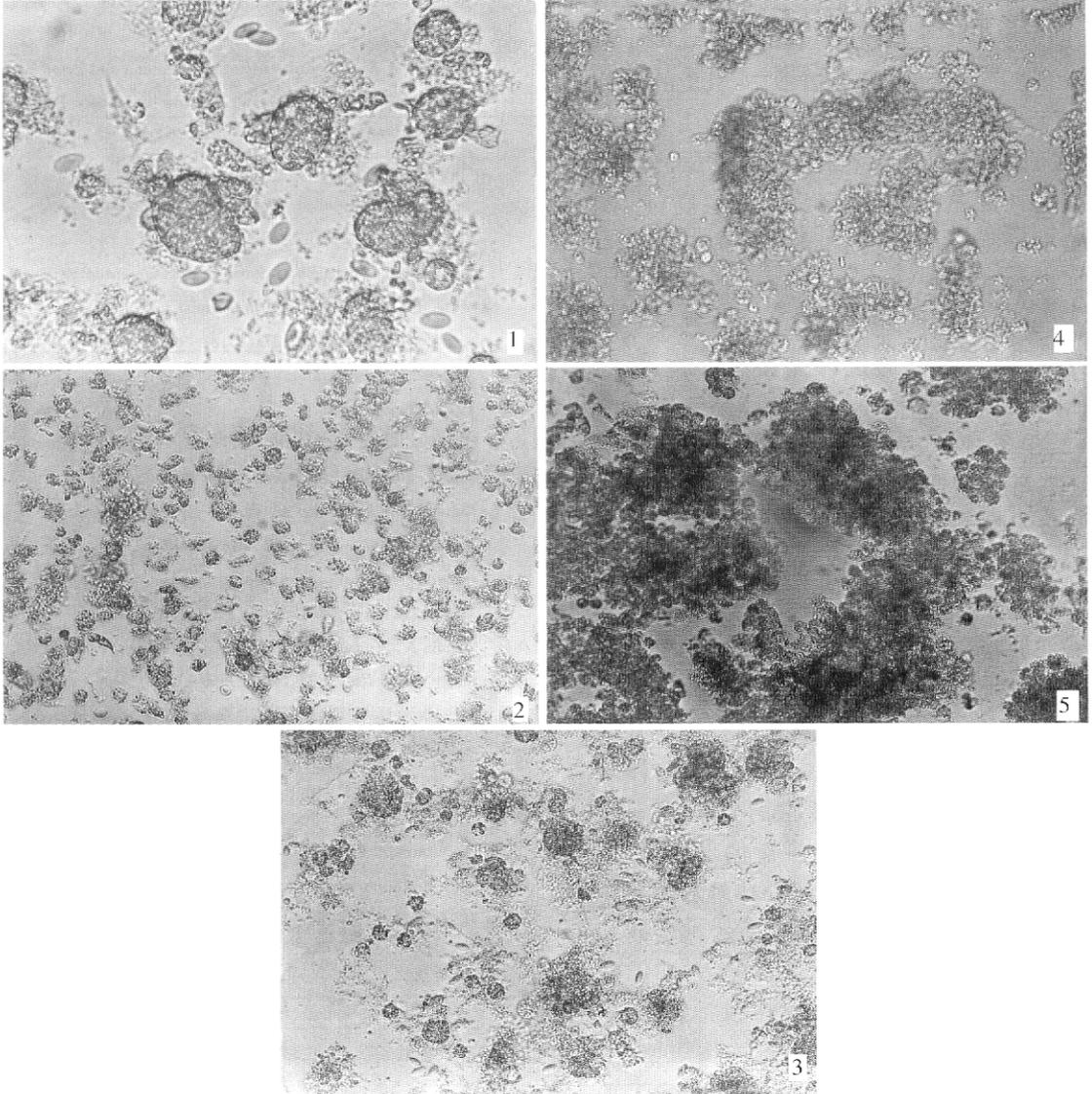
- [1] 程宝鸾. 动物细胞培养技术. 广州:华南理工大学出版社, 2001.
- [2] Boldyrev A A. Carnosine Biological Meaning and Possibility of Medical Application. Moscow: Moscow University Publishing House, 1998.
- [3] Hipkiss A R, Chana H. Carnosine protects proteins against methylglyoxal-mediated modifications. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **248**(1): 28 ~ 32.
- [4] Hipkiss A R, Michaelis J, Syrris P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine: a potential anti-protein-cross-linking agent. *FEBS Lett*, 1995, **371**(1): 81 ~ 85.
- [5] Seglen P O. Preparation of rat liver cells. *Exp Cell Res*, 1973, **82**: 391 ~ 398.
- [6] Mcfarland G A, Holliday R. Further evidence for the rejuvenating effects of the dipeptide L-carnosine on cultured human diploid fibroblasts. *Experimental Gerontology*, 2000, **34**(1): 35 ~ 45.
- [7] Mcfarland G A, Holiday R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblast by carnosine. *Exp Cell Res*, 1994, **212**(2): 167 ~ 175.
- [8] Azuma N, Yamauchi K. A glyco-phosphoprotein in human milk. *Dairy Res*, 1987, **54**(2): 199 ~ 205.
- [9] Mcfarland G A, Holiday R. Differential response of embryonic stem cells and teratocarcinoma cells to carnosine. *In Vitro Cell Dev*, 1999, **35**(1): 15 ~ 16.
- [10] Sachi Sri Kantha, Shun-ichi Wada, et al. Carnosine sustains the retention of cell morphology in continuous fibroblast culture subjected to nutritional insult. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **223**: 278 ~ 282.

李文清等:肌肽对离体培养的鸡肝细胞的影响

图版 I

LI Wen-Qing *et al.*: The Effect of Carnosine on the Chicken Hepatocytes *in Vitro*

Plate I



1. 刚分离出的鸡肝细胞(40 × 10);
2. 20 μmol/L 肌肽组在培养 24 h 的细胞形态(20 × 10);
3. 对照组在培养 24 h 的细胞形态(20 × 10);
4. 无血清 20 mmol/L 肌肽组鸡肝细胞第 8 d 形态(仍保持细胞形态)(20 × 10);
5. 无血清对照组鸡肝细胞第 4 d 形态(出现漂浮)(20 × 10)。