

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2019.10.041

茶多酚对宰后牦牛肉线粒体细胞凋亡和肌肉嫩度的影响

王琳琳¹ 陈炼红¹ 韩玲² 李键¹ 余群力² 蔡自建¹

(1. 西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041; 2. 甘肃农业大学食品科学与工程学院, 兰州 730070)

摘要: 为探究茶多酚对宰后牦牛肉成熟过程中线粒体氧化应激损伤介导的线粒体细胞凋亡级联反应及对肌肉嫩度的影响,以经茶多酚处理的牦牛背最长肌为研究对象,测定对照组和茶多酚处理组线粒体氧化应激水平、线粒体氧化损伤程度、线粒体功能特性、线粒体细胞凋亡进程,以及肌肉嫩度的变化。结果表明,在宰后成熟早中期,茶多酚组线粒体活性氧(Reactive oxygen species,ROS)水平、丙二醛(Malondialdehyde,MDA)以及羰基含量整体上显著或极显著低于对照组;成熟中后期,线粒体超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)活性以及线粒体膜流动性显著或极显著高于对照组。24 h后,茶多酚组线粒体通透性转换孔(Mitochondrial permeability transition pore,MPTP)开放程度显著或极显著低于对照组;6~168 h,茶多酚组线粒体 Cyt-c 浓度均高于对照组;72~168 h,胞浆细胞色素 c(Cytochrome c,Cyt-c)浓度均显著或极显著高于对照组;在成熟早期,细胞凋亡酶-3(Caspase-3)活性以及肌原纤维小片化指数(Myofibrillar fragmentation index,MFI)显著或极显著低于对照组。以上研究结果说明,茶多酚通过抑制ROS介导的氧化应激对线粒体结构和功能的损伤,起到抑制线粒体细胞凋亡级联反应对肌肉嫩度的改善作用,表明茶多酚在发挥抗氧化剂和保鲜剂作用、提高肌肉品质的同时,从细胞凋亡嫩化机制角度出发,对肌肉的嫩化产生不利影响。

关键词: 牦牛肉; 茶多酚; 氧化应激; 细胞凋亡; 肌肉嫩度

中图分类号: TS251.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2019)10-0352-08

Effects of Tea Polyphenols on Mitochondrial Apoptosis and Meat Tenderness in Post-mortem Yak Meat

WANG Linlin¹ CHEN Lianhong¹ HAN Ling² LI Jian¹ YU Qunli² CAI Zijian¹

(1. College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China
2. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Aiming to investigate the effects of tea polyphenols on the mitochondrial apoptosis cascade reaction mediated by mitochondrial oxidative stress and tenderness of yak meat during postmortem aging. The *longissimus dorsi* muscles injected with inhibitor tea polyphenol were taken as the experiment objects. The levels of mitochondrial oxidative stress, degree of mitochondrial oxidative damage, mitochondrial functional characteristics, process of mitochondrial apoptosis and change of meat tenderness in the control group and the treatment group were measured. The results showed that the level of mitochondrial ROS, MDA and carbonyl content in the treatment group was overall significantly or extremely significantly lower than that in the control group in the early of postmortem aging. At the middle and late of aging time, the SOD activity and the mitochondrial membrane fluidity was significantly or extremely significantly higher than that in the control group. After 24 h, opening of the MPTP in the treatment group was significantly or extremely significantly lower than that in the control group. After 6~168 h, the Cyt-c concentration of mitochondria in the treatment group was higher than that in the control group; during 72~168 h, the Cyt-c concentration of cytoplasm in the treatment group was significantly or extremely significantly higher than that in the control group. Meanwhile, Caspase-3 activity and MFI in the treatment group was significantly or very significantly lower than that in the control group at early aging time. The research

收稿日期: 2019-07-12 修回日期: 2019-08-22
基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(2019NQ43)、国家自然科学基金项目(31560463)和国家肉牛牦牛产业技术体系项目(CARS-38)
作者简介: 王琳琳(1988—),女,讲师,博士,主要从事畜产品加工研究,E-mail: jiayouwl123@163.com
通信作者: 余群力(1962—),男,教授,博士生导师,主要从事畜产品加工研究,E-mail: yuqunlihl@163.com

demonstrated that tea polyphenols inhibited the role of the mitochondrial apoptosis cascade reaction on the meat tenderization by inhibiting ROS mediated oxidative stress damage of mitochondrial structure and function. These observations indicated that tea polyphenols acted as the antioxidants and antistaling agent in improving the quality of meat at the same time, may have adverse effects on meat tenderization from the angle of the mechanism of apoptosis tenderization and further confirmation was needed.

Key words: yak meat; tea polyphenols; oxidative stress; apoptosis; meat tenderness

0 引言

嫩度是评价肌肉品质的重要指标之一。肉品科学领域早期研究指出,肌细胞内钙激活酶和组织蛋白酶两大内源酶系能对肌纤维骨架蛋白进行降解,进而起到改善肌肉嫩度的作用^[1]。随着肌肉嫩化理论不断完善,内源性细胞凋亡酶(Caspase)被证实也能降解肌原纤维蛋白,并成为参与宰后肌肉嫩化过程的第三大内源酶系^[2]。细胞凋亡是细胞在接受某种信号或某些刺激后发生的一种自主有序的死亡过程,也称为程序性死亡,它分为内源性线粒体凋亡途径和外源性死亡受体途径,其中线粒体凋亡途径被认为是引起肌肉嫩度改善的主要途径^[3]。而细胞色素 c(Cyt-c)从线粒体释放到胞浆的过程对线粒体细胞凋亡途径的激活具有重要意义,且此过程与 MPTP 密切相关。MPTP 是位于线粒体内、外膜之间,由多种线粒体蛋白构成的非特异性复合孔道,主要受到线粒体 Ca²⁺ 超载和 ROS 介导的氧化应激调控,是近年来研究凋亡途径激活机制的主要方向^[4]。

茶多酚是茶叶中多酚类物质的总称,也是一种复合型的天然抗氧化剂,具有抗氧化、抑菌、抗病毒、抗肿瘤、抗辐射等功能^[5]。在细胞凋亡研究领域,对茶多酚在凋亡发生过程中的作用存在诸多争议,有研究者指出,茶多酚可通过对抗细胞内氧化应激起到抑制细胞凋亡的作用,也有学者持相反观点。文献[6]研究发现,茶多酚可抑制由高糖诱导的人晶状体上皮细胞凋亡,同时茶多酚也能对甲基汞所致大鼠大脑皮质神经元的氧化损伤起保护作用,并降低细胞凋亡率^[7]。虽然茶多酚在多种细胞模型中都被证实能够抑制细胞凋亡,但也有学者认为,茶多酚可能通过不同的信号通路和途径在不同的细胞模型中发挥诱导凋亡作用。文献[8]研究发现,在羊肉宰后成熟过程中茶多酚可通过促进 pro-Caspase-3(Caspase-3 酶原)降解激活 Caspase-3,进而诱导细胞凋亡的发生。茶多酚也可能通过导致 ROS 过量积累、激发 Caspase 级联反应发生,进而诱导细胞凋亡^[9]。茶多酚可剂量依赖地诱导卵巢癌 SKOV3 细胞发生凋亡,且这种诱导作用可能是通过增加细胞内的 ROS 水平而实现的^[10]。同时,茶多

酚活性成分没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)也可通过多种方式诱导细胞凋亡^[11]。茶多酚对细胞凋亡途径的作用受到诸多因素影响,如细胞类型、浓度、信号通路以及活性成分等。目前,在肉品科学领域茶多酚主要作为抗氧化剂和保鲜剂起到改善肌肉品质、延长货架期的作用^[12]。而在肌肉宰后细胞凋亡发生过程中,茶多酚起诱导凋亡作用还是抑制凋亡作用,并对肌肉嫩度造成何种影响,尚未见相关研究报道。

本文以茶多酚处理的牦牛背最长肌为试验对象,测定肌肉宰后成熟过程中对照组和茶多酚组线粒体氧化应激水平、线粒体氧化损伤程度、线粒体功能特性、线粒体细胞凋亡进程,以及嫩度的变化,探究茶多酚对宰后牦牛肉线粒体氧化应激水平的影响和茶多酚在宰后肌肉成熟过程中对细胞凋亡发生的影响作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料:随机选取平均年龄 3.5 岁、生长发育良好、体质量相近,在相同饲养环境条件下生长的牦牛 10 头(青海百德投资发展有限公司提供),宰前禁食 16 ~ 18 h,禁水 2 h。

试验试剂:甘露醇、蔗糖、乙二胺四乙酸(EDTA)、4-丙磺酸基吗啉、牛血清白蛋白(BSA)、硫酸铜、2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH - DA)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、1-苯胺-8 萘磺酸(ANS)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)、连二亚硫酸钠、氯化钠(KCl)、磷酸钾(K₃PO₄)、氯化镁(MgCl₂)、叠氮化钠(NaN₃),以上试剂均为分析纯;SOD(线粒体超氧化物歧化酶)活性检测试剂盒、MDA(丙二醛)含量检测试剂盒、羰基含量检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;Caspase-3 活性检测试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司。

1.2 仪器与设备

XH - B 型旋涡混合器,江苏康健医疗用品有限公司;HH - 4 型恒温水浴锅,北京科伟永兴有限公司;TGL - 16M 型高速台式冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;XHF - D 型高速分散内切式匀浆仪,浙江宁波新芝生物科技股份有限公司;

RF 5301 – PC 型荧光分光光度计,日本岛津公司; UV2550 型紫外可见分光光度计,日本岛津公司; Spectramax M2 型酶标仪,美国美谷分子仪器有限公司; BX61 型正置万能显微镜,日本 Olympus 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 样品采集和处理

宰后从胴体上取背最长肌 (*Longissimus dorsi*, LD),并迅速将其切成大小相同质量在 60 g 左右的肉样,取 3 块放入液氮中作为 0 h 样品,并将其余肉样随机分成两组,第 1 组均匀注射质量分数为 0.3% 的茶多酚溶液(料液比 10 g/mL),未经任何处理的肉样作为空白对照样品,将上述样品置于 0 ~ 4℃ 条件下,自然成熟 0、6、12、24、72、120、168 h,并在相应时间点取样后放入 - 80℃ 超低温冰箱中待测。

1.3.2 线粒体提取

参考文献[13]的方法,将牦牛背最长肌肉样剪碎后置于 10 倍体积的线粒体分离介质(220 mmol/L 甘露醇、70 mmol/L 蔗糖和 2.0 mmol/L EDTA, 5.0 mmol/L 4-丙磺酸基吗啉和 0.5% BSA, pH 值 7.4)中,用高速匀浆机匀浆。匀浆液于 4℃、1 000 g 离心 10 min,相同条件下两次离心后,取上清液再 8 000 g 离心 20 min,所得沉淀为线粒体,上清液为胞浆。用双缩脲法测定蛋白质质量浓度。

1.3.3 线粒体 ROS 水平测定

参考文献[14]的方法并稍作修改。纯化的线粒体悬浮液(蛋白质质量浓度 0.1 mg/mL)与含有 5 μmol/L DCFH – DA 荧光试剂的 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4)混合均匀后,将上述混合溶液迅速转入 37℃ 水浴锅中避光孵育 15 min,随后于 4℃、12 000 g 条件下离心 8 min,立即用荧光分光光度计测定线粒体荧光强度(激发波长、发射波长分别为 488、525 nm),并将测定荧光强度后的样品置于荧光显微镜下,观察线粒体荧光水平。

1.3.4 SOD 活性、MDA 含量以及羰基含量测定

参照试剂盒说明书的方法测定线粒体 SOD 活性、线粒体 MDA 含量及线粒体羰基含量。

1.3.5 线粒体膜流动性测定

参考文献[15]的方法,取 0.3 mol/L 甘露醇 5.65 mL、5 mmol/L ANS 溶液 60 μL 加入到 0.3 mL 纯化的线粒体悬浮液中,并混合均匀。1 min 后用荧光分光光度计测定混合液的荧光强度(激发波长、发射波长分别为 400、480 nm),狭缝宽度 5 nm。

1.3.6 MPTP 开放程度测定

参考文献[4]的方法,用 3 mL MPTP 测试介质(230 mmol/L 甘露醇、70 mmol/L 蔗糖,3.0 mmol/L

Hepes, pH 值 7.4)将纯化的线粒体蛋白质量浓度调至 0.3 mg/mL,取 1 mL 定量好的线粒体悬液与 3 mL MPTP 测试介质混匀后,用紫外分光光度计在 540 nm 处测定吸光度。

1.3.7 线粒体和胞浆中 Cyt-c 浓度测定

参考文献[16]的方法,用超声波仪在冰浴下破碎纯化的线粒体,然后取破碎后的线粒体悬浮液和胞浆各 1.5 mL,向其中分别加入 0.025 g 连二亚硫酸钠并摇匀,最后在 520 nm 处测定吸光度,并由标准曲线计算线粒体和胞浆中 Cyt-c 浓度。

1.3.8 Caspase-3 活性测定

Caspase-3 活性参照试剂盒说明书的方法进行测定。

1.3.9 MFI 测定

参考文献[17]的方法,取 2 g 肌肉样品,加入 10 倍体积 MFI (肌原纤维小片化指数)缓冲液(100 mmol/L KCl、20 mmol/L K₃ PO₄、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L MgCl₂、1 mmol/L NaN₃, pH 值 7.1),用匀浆机进行匀浆。匀浆液于 4℃、1 000 g 离心 15 min。沉淀用 20 mL MFI 缓冲液溶解,并于相同条件下离心 15 min,弃上清液。向沉淀中加入 10 mL MFI 缓冲液,混匀后用 200 目尼龙筛网过滤以除去结缔组织碎片。用双缩脲法测定肌原纤维蛋白悬液的蛋白浓度,并用 MFI 缓冲液将肌原纤维蛋白质量浓度稀释至 0.5 mg/mL,然后在 540 nm 处测定吸光度,吸光度乘以 200 即为 MFI。

1.4 数据处理

试验结果均采用平均值 ± 标准差表示,数据平行测定 3 次。用 SPSS 19.0 软件进行方差分析(ANOVA),用新复极差法(Duncan)进行多重比较,用 Origin 8.5 软件进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 线粒体氧化应激水平

ROS 是由线粒体产生的重要信号分子,生理状态下一定水平的 ROS 对于细胞增殖和信号传导具有重要作用,但 ROS 的过多积累会造成脂质过氧化和蛋白质氧化,细胞内酶的失活以及 DNA 的氧化损伤,进而引发细胞内部一系列氧化应激损伤,且其被证明是诱导细胞凋亡发生的主要原因之一^[18]。目前,主要采用 DCFH – DA 荧光探针检测细胞内 ROS 水平,DCFH – DA 可以自由穿过细胞膜并被细胞内的酯酶水解生成 DCFH(2,7-双氯荧光素蛋白),而 ROS 能将无荧光的 DCFH 氧化成有荧光的 DCF(二氯荧光素),且绿色荧光越多,说明 ROS 水平越高^[19]。由图 1 可知,对照组和茶多酚组线粒体 ROS

荧光强度均随着成熟时间延长呈先下降后上升再下降的变化趋势;成熟过程中,茶多酚组发绿色荧光的线粒体数量明显少于对照组,说明茶多酚组线粒体

ROS 水平低于对照组,表明茶多酚处理能在一定程度上降低线粒体 ROS 水平。

氧化应激是当细胞内 ROS 的过多积累超过内

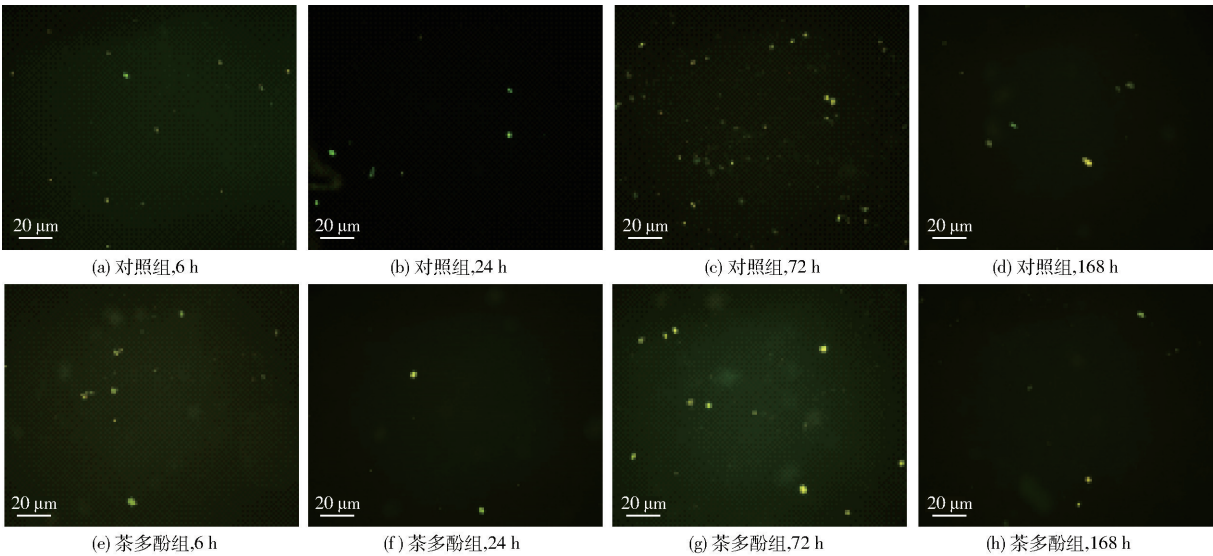


图 1 茶多酚处理对宰后牦牛肉成熟过程中线粒体 ROS 荧光强度的影响

Fig. 1 Effects of tea polyphenol on fluorescence intensity of ROS of yak LD muscle during postmortem aging

源性抗氧化防御系统对其的消除能力时过剩的 ROS 就会参与氧化生物大分子,从而造成细胞毒性或者线粒体损伤的生物学过程^[20]。由图 2a(图中小写字母表示对照组指标在成熟过程中变化差异显著($P < 0.05$),大写字母表示茶多酚组指标在成熟过程中变化差异显著($P < 0.05$);对照组和茶多酚组指标在同一成熟时间点变化差异显著用“*”($P < 0.05$)表示,差异极显著用“**”($P < 0.01$)表示,下同)可看出,宰后成熟过程中,对照组和茶多酚组线粒体 ROS 水平呈先下降后上升再下降的变化趋势($P < 0.05$),与图 1 基本吻合,原因可能是宰后缺氧缺血环境致使线粒体 ROS 不断增多,但因线粒体基质和线粒体膜中存在的 SOD、过氧化氢酶等内源抗氧化酶和非酶抗氧化因子的作用有效清除了部分 ROS,但随着线粒体自身抗氧化能力的减弱,在成熟后期两组肉样线粒体 ROS 水平又呈现上升趋势,文献^[21]研究发现,在鹅肉成熟早期肌肉中

ROS 的相对含量也是呈先下降后上升的变化,与本研究结果一致。0 ~ 72 h,茶多酚组线粒体 ROS 水平均极显著低于对照组($P < 0.01$),说明茶多酚通过抑制自由基的链式反应显著降低了线粒体 ROS 水平进而减弱线粒体的氧化应激强度,并可能进一步对细胞凋亡进程造成影响。SOD 是细胞内重要的抗氧化酶之一,可以专一性地清除细胞内的 ROS,是线粒体氧化损伤的重要评价指标。如图 2b 所示,两组肉样线粒体 SOD 活性整体呈先上升后下降的变化趋势。24 h 后,茶多酚组 SOD 活性显著($P < 0.05$)或极显著($P < 0.01$)高于对照组,说明茶多酚能够通过提高线粒体抗氧化酶 SOD 活性而对 ROS 进行清除,起到有效降低线粒体氧化应激水平的作用。

2.2 线粒体氧化应激损伤程度

过量产生的 ROS 主要通过攻击生物膜上的不饱和脂肪酸进而引起膜的脂质过氧化。MDA 可直

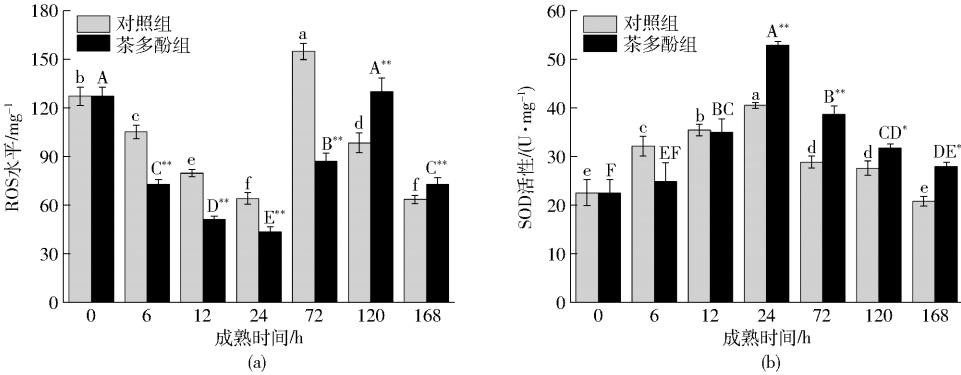


图 2 茶多酚处理对宰后牦牛肉线粒体 ROS 水平和 SOD 活性的影响

Fig. 2 Effects of tea polyphenol on level of ROS and SOD activity of yak LD muscle during postmortem aging

接反映细胞的脂质过氧化程度,也可间接反映细胞损伤程度,进而可表征细胞的氧化应激损伤的程度^[22]。如图 3a 所示,宰后 6~120 h,茶多酚组 MDA 含量均显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)低于对照组,说明茶多酚通过提高肌细胞线粒体 SOD 活性清除 ROS 的同时,有效降低了线粒体脂质过氧化程度,有研究证实茶多酚处理确实通过抑制细胞脂质

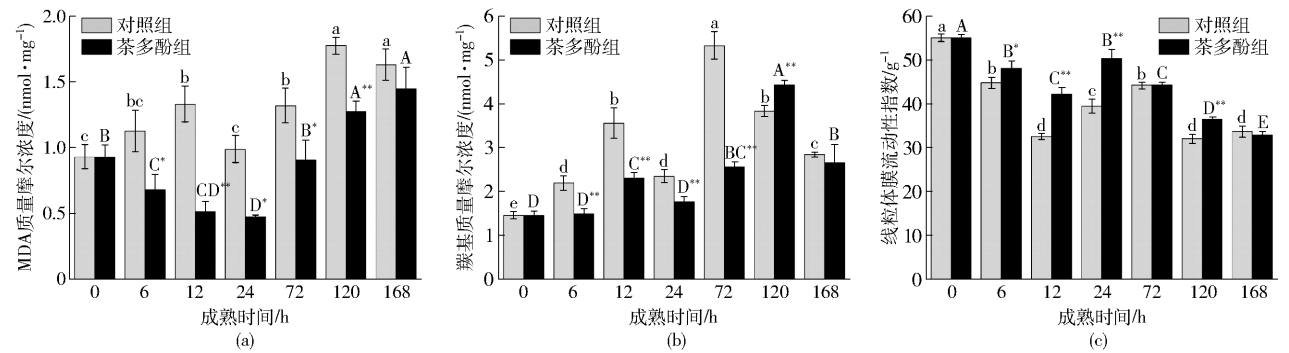


图3 茶多酚处理对宰后牦牛肉线粒体氧化损伤程度的影响

Fig. 3 Effects of tea polyphenol on degree of oxidative damage to mitochondria of yak LD muscle during postmortem aging

的不饱和脂肪酸,同时也会引起蛋白质的羰基化和蛋白质之间的交联和聚集,造成蛋白质氧化进而影响正常蛋白质的活性与功能^[21]。如图 3b 所示,宰后 6~72 h,茶多酚组线粒体羰基含量均极显著低于对照组($P<0.01$),原因是茶多酚显著抑制了线粒体蛋白质的氧化,降低了线粒体的氧化应激损伤程度。氧化应激引起的线粒体膜脂质和蛋白质的过氧化,会不同程度地降低线粒体膜的流动性,其也可用来评判线粒体膜的氧化损伤情况^[26]。由图 3c 可知,宰后 6~24 h 和 120 h,茶多酚组线粒体膜流动性均显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)高于对照组,也进一步证实茶多酚通过降低线粒体氧化应激水平,降低了线粒体氧化应激损伤,提高线粒体膜流动性,对线粒体起到保护作用。

2.3 线粒体功能

线粒体被认为是细胞凋亡发生的中枢调控者,对凋亡过程起着极其重要的调控作用,而作为线粒体进行内外信息传递的枢纽,MPTP 的开放状态是线粒体调控细胞凋亡发生的重要环节,MPTP 的开放程度直接关系到线粒体 Cyt-c 的释放情况以及凋亡的发生进程^[27]。有研究指出,肌细胞在严重缺氧的应激状态下时,线粒体 ROS 大量产生,促使线粒体内外膜间的 MPTP 构象改变,形成孔道后使线粒体内外膜间的各种促凋亡因子大量释放,最终引发细胞凋亡级联反应^[28]。由图 4 可知,6~12 h,两组 MPTP 开放程度无显著差异,而在成熟 24 h 后,茶多酚组 MPTP 开放程度显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)低于对照组,说明茶多酚通过降低线粒体氧

过氧化而降低了由 ROS 造成的氧化应激损伤^[23];茶多酚也可通过降低 MDA 含量,增强 SOD 活性而影响凋亡,起到抵抗乳腺上皮细胞氧化应激损伤的作用^[24];但也有研究指出,茶多酚并未通过降低细胞内 ROS 水平降低细胞的氧化应激水平,与本研究结果不一致,反而起相反作用^[25]。

细胞内过量产生的 ROS 不只攻击线粒体膜上

化应激损伤对线粒体结构和功能起到一定的保护作用,也可在一定程度上抑制 MPTP 介导线粒体 Cyt-c 的释放,可能对线粒体细胞凋亡进程起到阻碍作用。文献^[29]研究指出,H₂O₂处理后的牦牛肉在宰后成熟过程中 MPTP 的开放程度均强于对照组和抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)处理组,且 NAC 处理组 MPTP 的开放程度最弱,与本研究类似,均表明抗氧化剂起到保护线粒体功能的作用,降低了 MPTP 的开放程度,进一步对细胞凋亡级联反应起抑制作用。

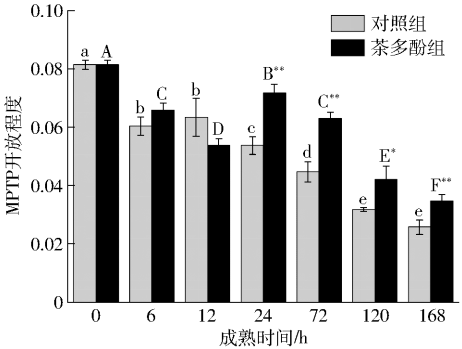


图4 茶多酚处理对宰后牦牛肉成熟过程中 MPTP 开放程度的影响

Fig. 4 Effect of tea polyphenol on MPTP opening of yak LD muscle during postmortem aging

2.4 成熟过程中细胞凋亡进程

2.4.1 线粒体 Cyt-c 释放程度

Cyt-c 作为线粒体呼吸传递链中的基本成分,在氧化还原和能量代谢过程中发挥重要作用,同时 Cyt-c 在线粒体细胞凋亡途径的激活中也起到重要的调控作用。当 MPTP 开放并伴随线粒体膜电位下降时,Cyt-c 从线粒体释放到胞浆中后,与胞浆中

Apaf-1(凋亡蛋白活性因子-1)和 Caspase-9 前体结合形成凋亡小体,激活下游 Caspase-3,并引发 Caspase 级联反应信号逐级放大最终诱导凋亡发生,Cyt-c 的释放程度对线粒体凋亡的发生具有非常重要的介导作用^[30]。由表 1 分析可知,宰后成熟过程中(6~168 h),茶多酚组线粒体 Cyt-c 浓度均高于对照组,并在 12 h 和 72 h 存在显著差异,说明茶多酚通过防护线粒体氧化损伤以及对其功能的保护作

用,减弱了 MPTP 对 Cyt-c 的释放。宰后 6~12 h,茶多酚组胞浆 Cyt-c 浓度显著低于对照组,说明茶多酚在成熟早期显著抑制了线粒体 Cyt-c 的释放;同时,成熟 72 h 后,茶多酚组胞浆 Cyt-c 浓度均显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)高于对照组,表明随着茶多酚抗氧化能力的减弱,线粒体在成熟后期受到 ROS 介导的氧化应激损伤,使其大量释放 Cyt-c 而导致胞浆 Cyt-c 增多。

表 1 茶多酚处理对宰后牦牛肉成熟过程中 Cyt-c 释放程度的影响
Tab.1 Effect of tea polyphenol on release of Cyt-c of yak LD muscle during postmortem aging

指标	处理	成熟时间/h						
		0	6	12	24	72	120	168
线粒体 Cyt-c 浓度/(mmol·L ⁻¹)	对照组	(11.233 ± 0.516) ^b	(12.934 ± 0.437) ^a	(11.500 ± 1.053) ^{ab}	(8.886 ± 1.045) ^c	(7.453 ± 0.877) ^d	(6.662 ± 1.139) ^d	(6.683 ± 0.491) ^d
		(11.233 ± 0.516) ^B	(13.262 ± 0.254) ^A	(13.893 ± 0.409) ^{A*}	(9.397 ± 0.325) ^{CD}	(10.099 ± 0.628) ^{C*}	(8.529 ± 1.169) ^{DE}	(7.595 ± 0.480) ^E
	茶多酚组	(0.681 ± 0.071) ^b	(0.920 ± 0.077) ^a	(0.797 ± 0.059) ^b	(0.510 ± 0.043) ^{de}	(0.614 ± 0.059) ^{cd}	(0.480 ± 0.072) ^e	(0.406 ± 0.083) ^e
		(0.681 ± 0.071) ^C	(0.787 ± 0.048) ^{B*}	(0.653 ± 0.034) ^{C*}	(0.531 ± 0.010) ^D	(0.915 ± 0.048) ^{A**}	(0.688 ± 0.072) ^{C*}	(0.550 ± 0.047) ^{D*}

2.4.2 Caspase-3 活性

细胞凋亡的发生受到诸多因素影响,其中 ROS 介导的氧化应激被认为是诱导凋亡发生的主要因素之一,也是近年来的研究热点。上述结果表征了茶多酚对线粒体氧化应激的影响,进而推测茶多酚可能会因对 ROS 的清除作用而影响其对细胞凋亡的介导作用。如图 5 所示,宰后 6~12 h,茶多酚组 Caspase-3 活性显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)低于对照组,说明与对照组相比,茶多酚确实在成熟早期通过抑制线粒体 Cyt-c 的释放而抑制了 Caspase-3 的激活,进而抑制了凋亡信号的逐级放大。而 24~72 h,茶多酚组 Caspase-3 活性显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)高于对照组,说明随着茶多酚抗氧化作用的减弱,对线粒体的保护作用相应下降而导致胞浆中不断增加的 Cyt-c 起到介导线粒体凋亡发生的作用;然而也有研究指出,羊肉经茶多酚处理后反而促进了线粒体 Cyt-c 的释放和 Caspase-3 的激活,与本研究结果相反,原因可能是所选骨骼肌类型和所探讨的分子机制不同^[8]。而在成熟后期(120~168 h),茶多酚组 Caspase-3 活性低于对照组,原因可能是茶多酚通过影响 Bcl-2 家族蛋白表达而对凋亡过程进行调控^[31]。Bcl-2 家族蛋白是线粒体凋亡途径的主要调控者,Bcl-2(抗凋亡蛋白)和 Bax(促凋亡蛋白)二者比例的变化对凋亡发生具有重要调控作用,当 Bax/Bcl-2 比例下降时会进一步抑制凋亡发生^[32]。ROS

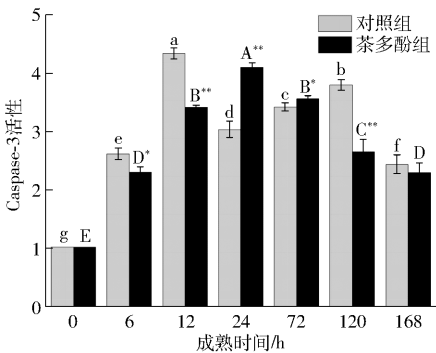


图 5 茶多酚处理对宰后牦牛肉成熟过程中 Caspase-3 活性变化的影响

Fig.5 Effect of tea polyphenol on changes in Caspase-3 activity of yak LD muscle during postmortem aging

介导的氧化应激也会通过提高 Bax/Bcl-2 的比例而诱导凋亡发生,抗氧化剂则可通过降低 Bax/Bcl-2 的比例抑制线粒体 Cyt-c 的释放,进而抑制凋亡级联反应扩大^[33-34]。同时,茶多酚可抑制在 H₂O₂ 介导下牙周膜细胞的活性降低、凋亡程度升高,MDA 含量增加伴随 SOD 活性降低,Caspases 和 Bax 的表达升高以及 Bcl-2 的表达降低,说明茶多酚通过减轻细胞氧化应激损伤,抑制线粒体细胞凋亡进程而对牙周膜细胞起保护作用^[35],与本研究结果类似。然而,也有研究指出茶多酚通过提高细胞内 ROS 水平,加剧线粒体损伤诱导卵巢癌细胞凋亡^[10],与本研究结果不一致,原因可能是所用细胞类型以及参与机制不同,相关具体机制有待进一步研究。

2.5 成熟过程中肌肉嫩化

肌肉宰后成熟过程中,肌原纤维蛋白如伴肌动蛋白、伴肌球蛋白、肌间线蛋白以及肌钙蛋白-T等骨架蛋白的降解促使肌原纤维M线消失、I带和Z线断裂,进一步导致肌原纤维有序排列遭到破坏,细丝结构弱化进而增加MFI,最终达到嫩化目的^[34]。同时,MFI常被用来作为肌肉嫩化程度的评价指标。如图6所示,随着成熟时间的延长,两组肉样MFI均呈显著上升变化规律($P < 0.05$),说明宰后成熟过程中肌肉嫩化过程不断进行,肌肉嫩化程度不断增强,肌肉嫩度不断得到提高,文献[17]研究也证实了在牦牛肉宰后成熟过程中MFI呈显著上升趋势,与本研究结果一致。同时,成熟早期(6~24 h),茶多酚组MFI均极显著低于对照组($P <$

0.01),说明茶多酚通过抑制线粒体细胞凋亡进程进一步抑制了其对肌肉嫩度的改善作用。宰后72 h,随着茶多酚抑制凋亡级联反应作用的减弱,Caspases继续起到降解下游肌原纤维蛋白的作用,从而使肌肉嫩化程度得到增强,但在成熟后期(120~168 h),可能因茶多酚通过其他方式抑制了凋亡进而对肌肉嫩化起到一定阻碍作用。以上研究说明,茶多酚不仅通过抗氧化作用对肌肉色泽、货架期等起保护作用,同时也可能通过其他方式或途径影响肌肉嫩度,具体机制有待进一步研究。

3 结论

- (1)茶多酚通过降低线粒体ROS水平和提高线粒体SOD活性,减弱了牦牛肉宰后成熟过程中线粒体氧化应激水平,并进一步抑制了氧化应激对线粒体脂质过氧化和蛋白质的氧化损伤,对线粒体结构和功能均起到一定保护作用。同时,茶多酚通过对线粒体结构和功能的保护,进一步抑制了线粒体Cyt-c的释放以及Caspase-3的活化,从而抑制了线粒体细胞凋亡级联反应进程,并最终阻碍了肌肉嫩化过程。
- (2)宰后牦牛肉成熟过程中,茶多酚可通过抑制ROS介导的氧化应激对线粒体结构和功能的损伤,起到抑制线粒体细胞凋亡级联反应改善肌肉嫩度的作用,表明茶多酚在发挥抗氧化剂和保鲜剂作用、提高肌肉品质的同时,通过抑制线粒体细胞凋亡途径对肌肉嫩化产生不利影响。

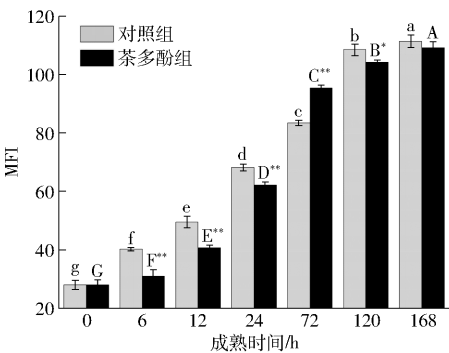


图6 茶多酚处理对宰后牦牛肉成熟过程中MFI变化的影响

Fig.6 Effect of tea polyphenol on changes in MFI of yak LD muscle during postmortem aging

参 考 文 献

[1] SENTANDREU M A, COULIS G, OUALI A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness[J]. Trends in Food Science and Technology, 2002, 13(12): 400-421.

[2] OUALI A, HERRERA-MENDEZ C H, COULIS G, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms[J]. Meat Science, 2006, 74(1): 44-58.

[3] OOI H K, MA L. Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway[J]. BMC Syst. Biol., 2013, 7(65): 1-18.

[4] WANG L L, MA X L, HAN L, et al. Effect of mitochondrial apoptotic activation through the mitochondrial membrane permeability transition pore on yak meat tenderness during postmortem aging[J]. Food Chemistry, 2017, 234(1): 323-331.

[5] IZDEBSKA M, KLIMASZEWSKA-WISNIEWSKA A, et al. Green tea extract induces protective autophagy in A549 non-small lung cancer cell line[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2015, 31(69): 1478-1484.

[6] 宫剑英, 苏胜, 康杨, 等. 茶多酚对高糖诱导人晶状体上皮细胞凋亡的影响[J]. 现代医学进展, 2016, 16(18): 3413-3416.

[6] GONG Jianying, SU Sheng, KANG Yang, et al. The effect of tea polyphenols on high glucose induced-human lens epithelial cell apoptosis[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(18): 3413-3416. (in Chinese)

[7] 刘巍, 徐兆发, 邓宇, 等. 茶多酚对甲基汞致大鼠神经毒性影响[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(7): 951-953.

[7] LIU Wei, XU Zhaofa, DENG Yu, et al. Effect of tea polyphenols on neurotoxicity induced by methylmercury in rats[J]. Chinese Journal of Public Health, 2012, 28(7): 951-953. (in Chinese)

[8] 张爽. 细胞凋亡诱导剂对羊肉成熟过程Caspase-3激活通路的机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.

[8] ZHANG Shuang. The mechanism of apoptosis inducers on Caspase-3 activation pathway during maturation of lamb[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2018. (in Chinese)

[9] 连超群, 夏俊, 高琴, 等. 茶多酚诱导人胆囊癌细胞系GBC-SD细胞凋亡的机制[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(10): 2077-2080.

- LIAN Chaoqun, XIA Jun, GAO Qin, et al. A study on apoptosis in human gallbladder carcinoma GBC - SD cells induced by tea polyphenols[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2012, 32(10): 2077 - 2080. (in Chinese)
- [10] 付春红, 张秦, 刘锦霞, 等. 茶多酚诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡及其机制的研究[J]. 医学研究生学报, 2012, 25(11): 1146 - 1150.
- FU Chunhong, ZHANG Qin, LIU Jinxia, et al. Tea polyphenols induce the apoptosis of ovarian cancer SKOV3 cells and its mechanism[J]. J. Med. Postgra., 2012, 25(11): 1146 - 1150. (in Chinese)
- [11] FANG C Y, WU C C, HSU H Y, et al. EGCG inhibits proliferation, invasiveness and tumor growth by up-regulation of adhesion molecules, suppression of gelatinases activity, and induction of apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(2): 2530 - 2558.
- [12] 姚永杰, 徐宝才, 王周平, 等. 天然保鲜剂复配工艺优化及其对水晶肴肉中特定腐败菌的抑制效果[J]. 食品科学, 2016, 37(22): 1 - 6.
- YAO Yongjie, XU Baocai, WANG Zhouping, et al. Optimization of blends of natural preservatives for improved antimicrobial effect against special spoilage organisms in Yao meat[J]. Food Science, 2016, 37(22): 1 - 6. (in Chinese)
- [13] LI J X, TONG C W, XU D Q, et al. Changes in membrane fluidity and lipid peroxidation of skeletal muscle mitochondria after exhausting exercise in rats[J]. European Journal of Applied Physiology & Occupational Physiology, 1999, 80(2): 113 - 117.
- [14] LEE J, YU B P, HERLIHY J T. Modulation of cardiac mitochondrial membrane fluidity by age and calorie intake[J]. Free Radical Biology & Medicine, 1999, 26(3 - 4): 260 - 265.
- [15] 姚婷婷, 朱丽琴, 杨双, 等. 一氧化氮对采后李果实线粒体膜氧化损伤的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(13): 2767 - 2774.
- YAO Tingting, ZHU Liqin, YANG Shuang, et al. Effect of NO on oxidative damage to mitochondrial membrane in harvested plum fruit[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(13): 2767 - 2774. (in Chinese)
- [16] 辛国荣, 姜广林, 高艳华, 等. 肝硬化门脉高压症中肝细胞线粒体钙、细胞色素 C 与细胞凋亡的关系[J]. 中国组织工程研究, 2007, 11(47): 9456 - 9461.
- XIN Guorong, JIANG Guanglin, GAO Yanhua, et al. Mitochondrial calcium, cytochrome C and apoptosis of hepatic cells after hepatic cirrhosis portal hypertension[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007, 34(3): 9456 - 9461. (in Chinese)
- [17] TIAN J C, HAN L, YU Q L, et al. Changes in tenderness and cathepsins activity during post mortem ageing of yak meat[J]. Canadian Journal of Animal Science, 2013, 93(3): 321 - 328.
- [18] KOWALTOWSKI A J, DE SOUZA-PINTO N C, CASTILHO R F. Mitochondria and reactive oxygen species [J]. Hypertension, 2009, 47(4): 333 - 343.
- [19] KHAN M, DING C, RASUL A, et al. Isoalantolactone induces reactive oxygen species mediated apoptosis in pancreatic carcinoma PANC - 1 cells[J]. International Journal of Biological Sciences. 2012, 8(4): 533 - 547.
- [20] LIU L, LIU Y, CUI J, et al. Oxidative stress induces gastric submucosal arteriolar dysfunction in the elderly[J]. World Journal of Gastroenterology, 2013, 19(48): 9439 - 9446.
- [21] 张玉林. 宰后活性氧簇 (ROS) 的形成对鹅肉品质影响机制的研究[D]. 宁波: 宁波大学, 2014.
- ZHANG Yulin. The mechanism of the influence on meat quality of goose muscle caused by the generation of reactive oxygen species (ROS) after slaughter[D]. Ningbo: Ningbo University, 2014. (in Chinese)
- [22] 柯鑫文, 武政华, 冯少勇, 等. 茶多酚对精索静脉曲张大鼠睾丸组织氧化应激和细胞凋亡的影响[J]. 现代泌尿外科杂志, 2015, 20(7): 505 - 508.
- KE Xinwen, WU Zhenghua, FENG Shaoyong, et al. The effects of tea polyphenol on the oxidative stress and cellular apoptosis of testicular tissues in rat varicocele[J]. Journal of Modern Urology, 2015, 20(7): 505 - 508. (in Chinese)
- [23] NEGRI A, NAPONELLI V, RIZZI F, et al. Molecular targets of epigallocatechin-gallate (EGCG): a special focus on signal transduction and cancer[J]. Nutrients, 2018, 10(12): 1936.
- [24] 王振云, 周璇, 李惠侠, 等. 茶多酚对氧化应激所致奶牛乳腺上皮细胞损伤的保护作用[J]. 南京农业大学学报, 2012, 35(3): 101 - 106.
- WANG Zhenyun, ZHOU Xuan, LI Huixia, et al. Protective effect of green tea polyphenols on oxidative stress-induced bovine mammary epithelial cells injury[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2012, 35(3): 101 - 106. (in Chinese)
- [25] PHURIWAT K, PATTAMAPHRON P, LYSIANE R, et al. Epistuctured catechins, EGCG and EC facilitate apoptosis induction through targeting de novo lipogenesis pathway in HepG2 cells[J]. Cancer Cell International, 2018, 18(1): 1457 - 2867.
- [26] COLELL A, GARCÍA RUIZ C, MARI M, et al. Mitochondrial permeability transition induced by reactive oxygen species is independent of cholesterol-regulated membrane fluidity[J]. Febs Letters, 2004, 560(1 - 3): 63 - 68.
- [27] 王琳琳, 余群力, 韩玲, 等. 宰后牦牛肉细胞凋亡发生对肌肉内环境及嫩度的影响[J/OL]. 农业机械学报, 2017, 48(7): 317 - 324.
- WANG Linlin, MA Junyi, YU Qunli, et al. Effects of apoptosis on muscle internal environment and tenderness during yak meat postmortem aging[J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017, 48(7): 317 - 324. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?flag=1&file_no=20170740&journal_id=jcsam. DOI: 10.6041/j. issn. 1000-1298. 2017. 07. 040. (in Chinese)

- [16] 李哲,魏志军,张平. 自力式调压阀变开度流场及特性分析[J]. 推进技术, 2008, 29(5): 622–626.
LI Zhe, WEI Zhijun, ZHANG Ping. Analysis of characteristic and flow field of self operated pressure-regulating valve[J]. Journal of Propulsion Technology, 2008, 29(5): 622–626. (in Chinese)
- [17] 侯良学,崔晓春,陈志敏. 环状缝隙调压阀的一种设计方法和特性计算[J]. 机械科学与技术, 2012, 31(6): 1005–1009.
HOU Liangxue, CUI Xiaochun, CHEN Zhimin. Design and characteristic study of an annular ring pressure-regulating valve[J]. Mechanical Science and Technology for Aerospace Engineering, 2012, 31(6): 1005–1009. (in Chinese)
- [18] 陶刚,黎晓然,杨桦,等. 履带车辆综合传动数字控制换挡[J]. 北京理工大学学报, 2015, 35(7): 701–705.
TAO Gang, LI Xiaoran, YANG Hua, et al. Digital control for gear shift of tracked vehicle integrated transmission[J]. Transactions of Beijing Institute of Technology, 2015, 35(7): 701–705. (in Chinese)
- [19] 冯广斌,侯玉杰,孙华刚. 装甲车传动装置换挡缓冲调压仿真研究[J]. 计算机仿真, 2018, 35(11): 19–23.
FENG Guangbin, HOU Yujie, SUN Huagang. Simulation analysis of the gear shift buffer of the armored vehicles[J]. Computer Simulation, 2018, 35(11): 19–23. (in Chinese)
- [20] 李政,陈天毅,张新明. 调压阀快速开关定位控制算法研究[J]. 实验流体力学, 2013, 27(1): 98–101.
LI Zheng, CHEN Tianyi, ZHANG Xinming. Research on quickly positioning algorithm for an air pressure regulating valve[J]. Journal of Experiments in Fluid Mechanics, 2013, 27(1): 98–101. (in Chinese)
- [21] 吴国洋,何泽银,李国云,等. 调压阀内流道流场分析及阀芯结构改进[J]. 兰州理工大学学报, 2013, 39(3): 38–42.
WU Guoyang, HE Zeyin, LI Guoyun, et al. Flow field analysis of internal flow passage in pressure-regulating valve and spool structure improvement[J]. Journal of Lanzhou University of Technology, 2013, 39(3): 38–42. (in Chinese)
- [22] 张仪,周瑞祥,王文平,等. 飞机燃油加注系统中调压阀结构的优化改进[J]. 机床与液压, 2016(2): 113–117.
ZHANG Jin, ZHOU Ruixiang, WANG Wenping, et al. Structure improvement and optimization of the pressure-regulating valve in an aircraft fuel injection system[J]. Machine Tool and Hydraulics, 2016(2): 113–117. (in Chinese)
- [23] 马彪,叶明,陈民鉴. 车辆自动换挡缓冲控制设计[J]. 兵工学报(坦克装甲车与发动机分册), 1994(4): 58–62.
- [24] 宋俊,殷庆文,刘树敏,等. 液压系统优化[M]. 北京:机械工业出版社, 1996.
- [25] 赖宇阳,姜欣. Isight 参数优化理论与实例详解[M]. 北京:北京航空航天大学出版社, 2012.
- [26] 付永玲,祁晓野. LMS Imagine. Lab AMESim 系统建模和仿真参考手册[M]. 北京:北京航空航天大学出版社, 2011.

(上接第 359 页)

- [28] 杨森. ROS/MPTP 介导肌细胞凋亡在大鼠失神经骨骼肌萎缩中的实验研究[D]. 太原:山西医科大学, 2011.
YANG Sen. ROS and MPTP mediated apoptosis in denervated skeletal muscle atrophy in rats[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2011. (in Chinese)
- [29] WANG L L, YU Q L, HAN L, et al. Study on the effect of reactive oxygen species-mediated oxidative stress on the activation of mitochondrial apoptosis and the tenderness of yak meat[J]. Food Chemistry, 2017, 244: 394–402.
- [30] TAHA A, AMIN T, FERESHTEH R, et al. Oscillation of apoptosome formation through assembly of truncated Apaf-1[J]. European Journal of Pharmacology, 2015, 760: 64–71.
- [31] 宋兵兵. 四种典型茶类诱导 HepG2 人肝癌细胞凋亡及绿茶作用分子机制研究[D]. 西安:陕西师范大学, 2017.
SONG Bingbing. Studies on apoptosis of HepG2 human hepatocellular carcinoma cells induced by four typical tea and molecular mechanism of action of green tea[D]. Xi'an: Shanxi Normal University, 2017. (in Chinese)
- [32] YARON F, HERMANN S. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015, 16(6): 329–344.
- [33] REYNA D E, GAVATHIOTIS E. Liposomal permeabilization assay to study the functional interactions of the bcl-2 family: methods and protocols[J]. Methods in Molecular biology, 2019, 1877: 111–119.
- [34] CHEN L, FENG X C, LU F, et al. Effects of camptothecin, etoposide and Ca^{2+} on Caspase-3 activity and myofibrillar disruption of chicken during postmortem ageing[J]. Meat Science, 2011, 87(3): 165–174.
- [35] 刘彩宏,呼海燕. 茶多酚抑制过氧化氢诱导的牙周膜细胞损伤[J]. 口腔医学, 2017, 37(1): 24–27.
LIU Caihong, HU Haiyan. Inhibitory effect of tea polyphenols on H_2O_2 induced human periodontal cell injury [J]. Stomatology, 2017, 37(1): 24–27. (in Chinese)