过度煎炸油诱发大鼠肝脏损伤及其机理研究

张裕涵， 王雨扬， 商文婷， 周中凯*
（天津科技大学 食品科学与工程学院，天津 300457）

摘要： 通过采用定量灌胃的方式研究过度煎炸油(DFEO)的摄入对大鼠肝脏损伤的影响及其机理。研究发现：干预6周后，DFEO组肝脏指数显著下降(P<0.05)，血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平显著升高(P<0.01)。肝组织切片观察发现，DFEO组出现大量脂肪空泡，肝窦扩张，肝细胞界限不清，局部腺体出现炎性细胞浸润。RT-PCR结果表明：连续食用过度煎炸油会导致大鼠肝脏组织*Gsta2*、*Gsta3*、*Gclc*、*Gclm*基因显著下调(P<0.01)。因此，摄入过度煎炸油会破坏肝细胞正常的组织形态，长期摄入会破坏正常的基因表达，影响正常的生命活动。

关键词： 过度煎炸油；肝损伤；组织切片；实时定量PCR
中图分类号：TS 201.6 **文章编号：**1673-1689(2020)12-0100-05 **DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.12.015

Deep-Frying Oil Induced Liver Injury in Rats and Its Mechanism Studies

ZHANG Yuhan， *WANG Yuyang*， *SHANG Wenting*， *ZHOU Zhongkai**
(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The effects of deep-frying edible oil (DFEO) on liver injury in rats and its mechanism were studied using oralgavage of DFEO with given doses. After 6 weeks of intervention, liver index in the DFEO group decreased significantly(P<0.05), while the serum levels of aspartate transaminase (ALT) and aspartate aminotrans ferase (AST) significantly increased (P<0.01).Meanwhile, observation of tissue sections of liver showed that a large number of fat vacuoles and liver sinusoidal expansion in the DFEO group. However, liver cell boundaries were not clear and inflammatory cell infiltration appearedin local glands. The quantitative real-time PCR results showed that 6 weeks continuous consumption of DFEO would cause significant down-regulation of *Gsta2*、*Gsta3*、*Gclc*、*Gclm* in rat liver tissues(P<0.01). DFEO will cause serious damage to the liver tissue and destroyliver cell morphology, and its long-term intake will damage the normal gene expression leading tonormal life activities affection.

Keywords: deep-frying edible oils, liver injury, tissue section, quantitativereal-time PCR

收稿日期： 2019-05-22
基金项目： 国家“十三五”重点研发计划项目(2016YFD0400104-4)。
* **通信作者：** 周中凯(1964—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事食品科学与营养方面研究。E-mail：zkzhou@tust.edu.cn

近年来，人们的生活水平逐年提高，饮食结构发生了巨大的改变，煎炸食品由于其独特的口感和诱人的风味特别受消费者的青睐，与此同时人们对煎炸油的摄入量也急剧的增加[1-2]。在加热煎炸油的过程中，由于高温、水分、空气（氧气）的存在，使油脂分子发生许多复杂的氧化、水解、聚合反应。在这些反应过程中，会产生大量的有害物质，这些有害物质会对人类的健康产生不利的影响[3-4]。这也是近些年“三高”人群逐渐增多的原因之一。“三高”指高血压、高血糖和高血脂，这些慢性疾病也会进一步引发心血管疾病、糖尿病、动脉粥样硬化以及代谢综合征等，严重危害人类健康[5-6]。除此之外，过度摄入煎炸食品，除了油脂本身品质降低危害健康外，一些焙烤、煎炸食品在加工生产过程中由于食物组分的多样性、热不稳定性以及交互反应等也极易产生有毒有害物质，影响机体正常的必需脂肪酸的代谢，这也逐渐引起了人们的重视[7-8]。因此，探讨过度煎炸油在氧化变质，尤其是高温煎炸一些高淀粉和蛋白质食物后油脂成分的变化对动物机体的毒害作用，具有极其重要的意义。

肝脏是机体新陈代谢的主要器官，也是机体清除内毒素和解毒的重要器官，同时还是一些毒性物质首要攻击的靶器官，而肝脏主要的解毒方式是增加化合物的水溶性，加速它们的排出[9-10]。食用油脂在高温煎炸后会产生大量对机体有害的物质，例如一些多环芳烃以及一些氧化产物等[11-13]，大量摄入煎炸油无疑会大大加重肝脏解毒的负担，造成毒性物质的积累，损害肝细胞，破坏肝脏正常的生理功能。作者通过分子生物学手段以健康大鼠为研究模型探讨煎炸油对肝脏功能影响的机理，为人们以后的健康饮食提供科学指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 SPF 级成年 Wistar 大鼠 24 只（生产许可证编号 SCXK-（军）2012-0004，购自人民解放军军事科学医学院实验动物中心），体质量 290~310 g，于天津科技大学 SPF 级动物实验研究中心饲养。饲养条件：温度 20~25 ℃，湿度 50%~55%，正常采光；自由摄食进水，饲喂基础饲料。动物实验符合国家《实验动物管理条例》，并经天津科技大学动物饲养管理中心认可。

1.1.2 实验仪器与试剂 福临门一级大豆油：中粮食品营销有限公司产品。

MK-3 酶标仪：美国 Thermo 公司产品；Neofuge 13R 台式高速冷冻离心机：Heal Force Development Ltd 产品；梯度 PCR 仪：Bio-Rad 公司产品；UV-可见分光光度计：美国 Agilent 公司产品；BX51 显微镜：OLMPUS 公司产品；数显恒温水浴锅：巩义市予华仪器有限责任公司产品；超低温冰箱：美国 Thermo 公司产品。

血清谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、碱性磷酸酶（ALP）、总胆红素（TBIL）、白蛋白（ALB）试剂盒：南京建成生物制剂有限公司生产；RNA 提取试剂盒、RNA 反转录试剂盒、一步荧光定量 RT-PCR 试剂盒：宝生物工程（大连）有限公司产品；PCR 引物：由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 动物分组及处理 24 只受试动物在适应性喂养 1 周后，将其随机分为 3 组：对照组（Con 组）、正常油脂组（NEO 组）、过度煎炸油组（DFEO 组）。各组动物分别以生理盐水、正常油脂和过度煎炸油灌胃，每组每只大鼠定量 1.5 mL/d，各组动物自由进食基础饲料，共干预 6 周。

1.2.2 饲养条件 饲养条件以分笼饲养，每笼 4 只，自然昼夜，节律光照。基础饲料成分见表 1。

表 1 动物饲料成分表

Table 1 Ingredient list of animal feed

成分	质量分数/%	成分	质量分数/%
粗蛋白	≥18.0	钙	1.0~1.8
粗纤维	≤5.0	磷	0.6~1.2
粗脂肪	≥4.0	赖氨酸	≥0.82
水分	≤10.0	食盐	0.3~0.8
灰分	≤8.0		

1.2.3 过度煎炸油的制备 为模拟多次煎炸过程中油脂主要成分的变化，研究一些淀粉、蛋白质类食物煎炸后产生的毒性物质对机体的影响，参照 KULIGOWSKI 等[14]制备煎炸油脂的方法并作改进。具体做法为：将原样大豆油加热（控制在 190 ℃左右）后，间歇性煎炸薯条、鸡排、鱼丸、鸡翅、薯片、馒头片等，每天煎炸 5~6 h，如此重复约 1 周，制备过度煎炸油。处理完毕后，冷却，防止其在空气中氧化，密封保存备用。

1.2.4 各种指标的测试方法 相关指标的检测：大

鼠干预 6 周后,禁食不禁水 12 h 后,将大鼠放入乙醚麻醉盒中直至其角膜反射和痛觉反射消失,腹部主动脉取血,同时取肝脏组织后处死。全血静置 2~3 h,在高速冷冻离心机中离心(3 500 r/min,4 ℃,15 min),用移液器吸取上层血清分装到 eppendorf 管中,于-80 ℃超低温冰箱中保存。采用试剂盒法测定动物血清中各指标的含量,每组 8 个样品,3 组共计 24 个样品。指标测试严格按照试剂盒说明书要求,每个样品重测 3 次,取平均值。

基因的 mRNA 表达量:采用总 RNA 提取试剂盒提取大鼠肝脏组织总 RNA,严格按照试剂盒说明书操作,之后将 1 μg RNA 反转录为 cDNA 用于后续的实时定量 PCR 测定。以 18S 基因为内参基因,每次从 3 个试验组中取 1 个样本做试验,每个指标重复测定 3 次。RT-PCR 条件:95 ℃预变性 2 min,95 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,40 个循环后,72 ℃ 10 min 保证完全延伸。处理数据得到 mRNA 的相对表达量[15]。选取的内参基因及目的基因的引物序列见表 2。

表 2 用于扩增 mRNA 的实时定量 PCR 的引物序列表

Table 2 List of primers used to amplify mRNA by quantitative real-time PCR

基因	引物	5′→3′
18S	18S-F	AAACGGCTACCACATCCAAG
	18S-R	TTGCCCTCCAATGGATCCT
Gsta2	Gsta2F	GGAGAGAGCCCTGATTGACA
	Gsta2R	TTCAAAGGCAGGCAAGTACC
Gsta3	Gsta3F	GGGAAGCCAGTCCTTCACTA
	Gsta3R	GGTCATCCCGAGTTTTCAGA
Gclm	GclmF	TGTGTGATGCCACCAGATTT
	GclmR	GCTTTTCACGATGACCGAGT
Gclc	GclcF	CTGGGGAGTGATTTCTGCAT
	GclcR	AGATCTCCGTGTCGATGGTC

1.2.5 肝组织病理学观察及肝脏指数的计算

$$I=\frac{m_1}{m_0}\times 100\%$$

式中,I 为肝脏指数;m_1 为肝脏质量,g;m_0 为小鼠体质量,g。

处死大鼠后,速取肝脏并称质量,计算肝脏指数。于-80 ℃冰箱保存备用。取右前叶肝组织约 2 g,用体积分数 4%中性甲醛溶液固定,做石蜡切片,H & E 染色,镜下观察肝脏组织病理变化,判断肝损伤情况。

1.2.6 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件,试验结果以 $\bar{X}\pm S$ 表示,各组间采用 One-way ANOVA 进行统计学分析。

2 结果与讨论

2.1 各组大鼠体质量和肝脏指数水平

体质量等各项生理指标相同的大鼠在连续干预 6 周后发生明显变化,其中补充正常食用油干预的老鼠的体质量明显高于对照组(见表 3)。可见,过多的摄入正常油脂会使自身脂代谢增加,进而有诱发肥胖的可能。有报道指出我国人均油脂的摄入量已达到 44 g,已超过世界卫生组织规定的 30%。与此相一致的是肥胖和超重的人数也在逐年增加[16]。DFEO 组体质量最低,煎炸油脂的毒性已影响到机体正常的合成代谢,该组大鼠无法维持正常的生命活动。周雅琳[17]用煎炸油连续喂养大鼠 30 d 后发现,和喂食新鲜油的大鼠相比,雌鼠和雄鼠的体质量都明显降低。这个结果与我们的结果也是一致的。肝脏指数是评价肝脏病变的重要指标,其高、低水平可从侧面反映肝脏的机能情况。由以上数据看出,DFEO 组肝脏指数也发生明显变化,其肝脏指数 2.61 显著低于对照组的 2.91($P<0.05$),推测其原因可能是长时间干预后,一些毒性物质在肝脏中积累,毒害甚至杀死了部分肝细胞。

表 3 大鼠体质量和肝脏指数

Table 3 Body weight and liver index in rats

分组	初始体质量/g	最终体质量/g	肝脏指数/%
Con	294.2±10.2	429.5±26.8	2.91±0.11
NEO	301.5±8.9	443.8±31.9	2.96±0.16
DFEO	292.2±6.9	423.5±18.4	2.61±0.33*

注:* 表示与 Con 组对比具有显著差异($P<0.05$),** 表示与 Con 组对比差异极显著($P<0.01$),下同。

2.2 各组大鼠肝脏相关酶活力的变化

临床了解肝功能主要是通过检测血清中 ALT、AST、ALP、TBIL 等的水平。ALT 在肝细胞液中含量较高,AST 在线粒体中含量较高[18]。正常细胞由于细胞膜的包裹,所以 ALT 和 AST 不会释入血液中。肝细胞受到损害后,细胞变性、坏死,细胞膜破碎或细胞膜的通透性增加,肝细胞中所含的 ALT 和 AST 就会被释放到血液中,使血液中 ALT、AST 水平增加,因此 ALT 和 AST 是检验肝损伤灵敏而特异的

指标[19-20]。同时 ALP、TBIL、ALB 的含量也是肝功能检测常用的指标。检测血清中的 ALT、AST、ALP、TBIL 和 ALB 水平,可反映肝组织受损或病变情况[21]。表 4 显示,在持续干预 6 周后,DFEO 组大鼠血清中 ALT、AST 水平均比对照组极其显著升高(P<0.01);NEO 组大鼠血清中 ALT 水平略有升高。过度煎炸油已对大鼠肝脏造成严重损伤,肝细胞坏损,ALT、AST 大量流出,同时 ALP 水平也显著升高(P<0.05)。然而,TBIL 和 ALB 在正常油脂和煎炸油干预后无显著变化。

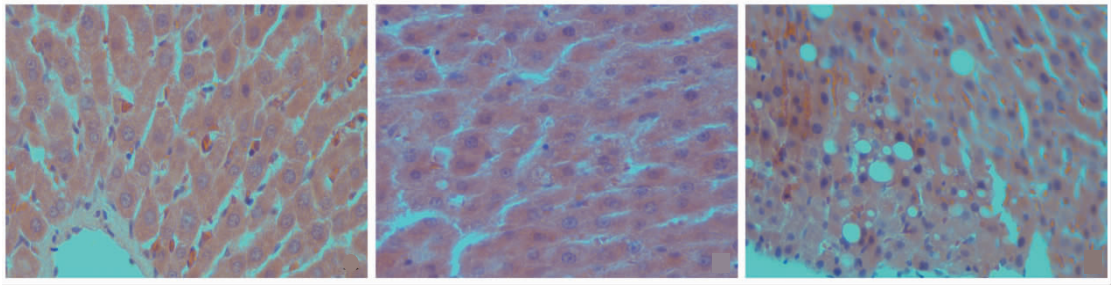
表 4 各组大鼠肝功能指标水平

Table 4 Liver function indexes of rats in each group

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	ALP/(U/L)	TBIL 质量浓度/(mg/dL)	ALB 质量浓度/(g/L)
Con	24.97±2.5	29.93±6.15	128.42±17.79	3.6±0.87	42.25±1.62
NEO	34.13±2.23*	38.41±3.99	170.41±42.98	3.5±0.67	40.1±2.17
DFEO	38.35±5.27**	46.58±10.09**	181.67±42.17*	4.24±0.62	40.09±3.2

2.3 各组大鼠肝脏病理学形态变化

在正常生理状态下,肝脏组织 H & E 染色切片图显示肝细胞排列整齐,以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞形状规则,细胞分界清晰,排列致密且均一,无细胞变性和异常,如图 1(a)所示。图 1(b)显示灌胃 6 周正常油脂后,肝组织切片显示有轻微变化,出现少量脂肪空泡。然而,食用煎炸油干预 6 周的大鼠则发生明显的病变,正常组织结构明显消失,肝细胞索排列紊乱,肝脏正常的放射状结构遭到破坏,出现大量红染颗粒,肝窦扩张,该组多只大鼠出现明显的脂肪大泡、弥漫性炎症浸润(见图 1(c)),从组织形态病理学来看,过度煎炸油对肝组织的损伤十分明显。



(a)Con (b)NEO (c)DFEO

图 1 各组大鼠肝组织病理学观察(H & E,×40)

Fig. 1 Pathology of liver in different groups

2.4 不同油脂对大鼠肝脏组织中相关 mRNA 表达的影响

谷胱甘肽硫转移酶(GST)是人体Ⅱ相代谢中至关重要的酶,它能催化谷胱甘肽与内源性和外源性的亲电子物质结合。该酶主要存在于肝脏内,微量存在于肾、小肠、睾丸、卵巢等组织中。由于肝细胞质内富含 GST,当肝细胞损害时,酶迅速释放入血液,导致血清 GST 活性升高。GST 的亚家族在人体和大鼠中主要为 *Gsta*、*Gstp*、*Gstm*[22]。图 2 中 DFEO 组 *Gsta2* 和 *Gsta3* 基因的表达量均明显下调(P<0.01),下调幅度接近 60%。可见,过度煎炸油中的毒性物质随时间的延长在肝脏积累,毒害杀死肝细胞的同时,也在很大程度上影响相关基因的表达,使肝脏解毒能力下降。*Gclc* 和 *Gclm* 都是谷氨酸半胱氨酸连接酶,也被称为 γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶,是谷胱甘肽合成的第一个限速酶,其基因 *Gclc* 和 *Gclm* 在 DFEO 组大鼠中也明显下调。由此可见,摄入过度煎炸油后,在很大程度上影响大鼠肝组织中 *Gsta2*、*Gsta3*、*Gclc*、*Gclm* 基因的表达量,破坏了肝脏正常的合成和代谢反应,进而影响机体正常的生命活动[23-25]。

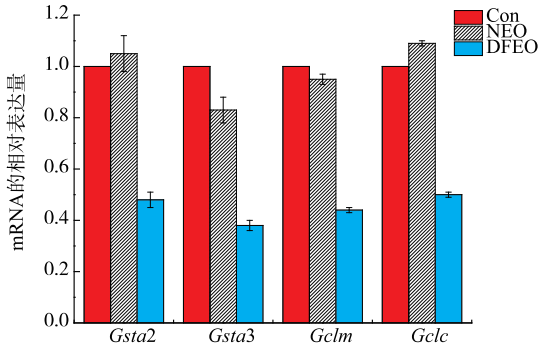


图 2　不同试验组 mRNA 的相对表达量

Fig. 2　Relative expression of mRNA in different groups

3 结　语

正常油脂在过度煎炸一些常见食物后会产生一些很强的毒性物质,摄入动物体后对肝组织造成很强的损伤，长期食用会破坏甚至杀死肝细胞,影响肝脏中一些重要基因的表达,严重危害肝脏正常的生理机能。在日常生活中应该少吃甚至远离煎炸食物,同时控制正常油脂的摄入量,少吃高油脂食物,倡导绿色健康饮食。

参考文献:

[1] 宋丽娟,于修烛,张建新,等. 煎炸油在薯片煎炸过程中的品质变化[J]. 食品科学,2011,32(5):70-74.
[2] 李东锐,毕艳兰,肖新生,等. 食用油煎炸过程中的品质变化研究[J]. 中国油脂,2006(6):34-36.
[3] 蔡文辞. 煎炸油中极性物质的分析及其细胞毒性评价[D]. 无锡:江南大学,2014.
[4] 陈雅琼,张铁英,陈元,等. 煎炸老油对小鼠重要脏器的影响[J]. 中国油脂,2014,39(12):38-41.
[5] 李云,沈丽琴,王鑫,等. 某单位职工 3 年健康检查高血压高血糖高血脂的检出情况[J]. 职业与健康,2013,29(16):037.
[6] 陈琦,马风兰,李铎. 煎炸添加深海鱼油的调和油对 SD 大鼠的安全性研究[J]. 中国食品学报,2014,14(3):22-29.
[7] FERREIRO-VERA C,PRIEGO-CAPOTE F,MATA-GRANADOS J M,et al. Short-term comparative study of the influence of fried edible oils intake on the metabolism of essential fatty acids in obese individuals[J]. **Food Chemistry**,2013,136(2):576-584.
[8] 刘元法,穆昭,单良,等. 煎炸油及其加热产生的极性物质致突变性研究[J]. 中国粮油学报,2010,25(6):51-55.
[9] 朱钦士. 我们的机体是如何解毒的[J]. 生物学通报,2013,48(7):13-19.
[10] 周纯生,庄颖,王帮霞,等. 反复煎炸食品的菜油致小鼠毒性作用的研究[J]. 蚌埠医学院学报,1999,24(5):301-304.
[11] LI G,WU S,WANG L,et al. Concentration,dietary exposure and health risk estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in youtiao,a Chinese traditional fried food [J]. **Food Control**,2016,59:328-336.
[12] MARTíNEZ-YUSTA A,GUILLEN M D. Deep-frying:a study of the influence of the frying medium and the food nature,on the lipidic composition of the fried food,using ^{1}H nuclear magnetic resonance[J]. **Food Research International**,2014,62:998-1007.
[13] 李浩南,邹勇,张彩,等. 煎炸油脂中极性物质组分检测方法[J]. 粮食与油脂,2006(5):18-21.
[14] KULIGOWSKI J,CARRIÓN D,QUINTÁS G,et al. Sample classification for improved performance of PLS models applied to the quality control of deep-frying oils of different botanic origins analyzed using ATR-FTIR spectroscopy [J]. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**,2011,399(3):1305-1314.
[15] LIVAK K J,SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\triangle\triangle CT}$ methods [J]. **Methods**,2001,25(4):402-408.
[16] 黄海滨. 平衡油脂对小鼠脂代谢的影响及其机理研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2015.
[17] 周雅琳. 煎炸油的品质评价及其极性化合物的快速检测技术研究[D]. 重庆:西南大学,2009.
[18] 麻晓林,陈伟,金榕兵. 肝损伤后检测肝功能指标的实验研究[J]. 创伤外科杂志,2003,5(1):20-22.
[19] 刘安军,王雅静,郑捷,等. 富铬盐藻对小鼠酒精性肝损伤的保护作用[J]. 现代食品科技,2011,27(12):1425-1427.
[20] 张蓓,薛长湖,周鑫,等. 海参和海星脑苷脂对大鼠急性肝损伤影响的比较研究[J]. 营养学报,2011,33(1):19-23.
[21] 林雪松. 肝功能检测指标的分析[J]. 中国医刊,2001,36(4):51-52.
[22] OMMEN B V,BOGAARDS J J P,PETERS W H M,et al. Quantification of human hepatic glutathione S-transferases [J]. **Biochemical Journal**,1990,269(3):609-613.
[23] SI X,ZHOU Z K,STRAPPE P,et al. A comparison of RS4-type resistant starch to RS2-type resistant starch in suppressing oxidative stress in high-fat-diet-induced obese rats[J]. **Food & Function**,2017,8(1):232-240.
[24] JUNG K A,KWAK M K. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants[J]. **Molecules**,2010,15(10):7266-7291.
[25] SHIMOTOYODOME A,SUZUKI J,FUKUOKA D,et al. RS4-type resistant starch prevents high-fat diet-induced obesity via increased hepatic fatty acid oxidation and decreased postprandial GIP in C57BL/6J mice [J]. **American Journal of Physiology Endocrinology & Metabolism**,2010,298(3):652-662.