

EGCG 抑制野百合碱诱导的大鼠右心室肥厚的影响

付正丰¹, 李晶¹, 岳秀永^{1*}, 苗加伟¹, 严磊²

(1. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 404120; 2. 重庆医科大学, 重庆 400016)

[摘要] 目的:观察表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对野百合碱(MCT)所致大鼠右心室肥厚的影响并探讨其可能的机制。方法:40只雄性SD大鼠随机分为正常组,模型组,EGCG(40 mg·kg⁻¹)组和阳性药卡托普利(25 mg·kg⁻¹)组,每组10只。除正常组外,采用野百合碱诱导制备右心室肥厚大鼠模型,24 h后各组分别ig给药,正常组和模型组ig等体积生理盐水,每天1次,连续21 d,观察EGCG对模型大鼠右室肥厚指数(RVHI),右室质量指数(RVMI),右室心肌细胞超微结构的变化影响;对右室心肌组织一氧化氮(NO),诱导性一氧化氮合酶(iNOS),白细胞介素-1 β (IL-1 β)及IL-6含量的影响。结果:与正常组比较,模型组RVHI,RVMI明显增高($P < 0.05$),其右室组织NO,iNOS,IL-1 β 及IL-6水平明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,EGCG(40 mg·kg⁻¹)组RVHI,RVMI明显降低($P < 0.05$),右室心肌组织的NO,iNOS,IL-1 β 及IL-6水平明显降低($P < 0.05$)。结论:EGCG能有效抑制MCT诱导的大鼠右心室肥厚,其作用途径与其降低右室心肌组织iNOS表达和NO过多产生及降低IL-1 β 及IL-6水平有关。

[关键词] 表没食子儿茶素没食子酸酯;右心室肥厚;野百合碱

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0126-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130126

Inhibiting Effect of EGCG on Right Ventricular Hypertrophy Induced by Monocrotaline in Rats

FU Zheng-feng¹, LI Jing¹, YUE Xiu-yong^{1*}, MIAO Jia-wei¹, YAN Lei² (1. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2. Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on right ventricular hypertrophy induced by monocrotaline (MCT) in rats and explore its mechanisms. **Method:** Forty male Wistar rats were randomly divided into the normal group, the model group, the captopril group (25 mg·kg⁻¹) and the EGCG (40 mg·kg⁻¹) group. MCT-induced right ventricular hypertrophy model in rats was established, and the effects on right ventricular hypertrophy index (RVHI), right ventricular myocardial infarction (RVMI), nitric oxide (NO), inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 of right ventricular hypertrophy myocardium tissue and right ventricular myocardial cells in rats were examined. **Result:** Compared with the normal group, RVHI and RVMI were significantly elevated ($P < 0.05$), and NO, iNOS, IL-6 and IL-1 β level of right ventricular hypertrophy myocardium tissue increased ($P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, RVHI and RVMI was obviously declined ($P < 0.05$), while levels of NO, iNOS, IL-6 and IL-1 β significantly decreased ($P < 0.05$) in the EGCG group. **Conclusion:** EGCG could significantly inhibit the RVH induced by MCT in rats. Its mechanisms may be related to reducing the levels of iNOS, NO, IL-1 β and IL-6 in right ventricular hypertrophy myocardium tissue.

[Key words] epigallocatechin gallate; right ventricular hypertrophy; monocrotaline

茶多酚是茶叶中含有的一种稠环芳香烃类物质,它是儿茶素类、黄酮及黄酮醇类、花色素类、酚酸

[收稿日期] 20141204(018)

[基金项目] 重庆市卫生局医学科研项目(2012-1-096);重庆市高等教育教学改革研究重点项目(132128,133309);万州区科技计划项目(201203055)

[第一作者] 付正丰,硕士,讲师,从事中西医结合临床及中药药理学方面研究,Tel:13996539870,E-mail:fuzz06@126.com

[通讯作者] *岳秀永,硕士,讲师,从事中西医结合临床及中药药理学方面研究,Tel:023-58556830,E-mail:mybestdorthy@hotmail.com

及缩酚酸类等多酚复合体的总称。茶多酚目前已在医疗和保健领域广泛使用,常与芦荟、荷叶、红花、西洋参、天然维生素 C、E 等配伍用于降脂保肝,瘦身美容、延缓衰老等。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是茶多酚中含量最高的单体化合物,占 50%~60%。在体外和动物模型上 EGCG 都显现出抗氧化、抗肿瘤、抗炎、降血脂、改善血管内皮功能、抗血小板聚集、防辐射、抗衰老以及改善肝功能等生物活性。本实验将 EGCG 应用于大鼠右室心肌肥厚的动物模型,观察大鼠用药后心肌的病理改变以及右室心肌组织中一氧化氮(NO),诱导型一氧化氮合酶(iNOS),白细胞介素 1 β (IL-1 β)及白细胞介素 6(IL-6)水平的变化^[1]。在预试验中发现 EGCG 在 10~100 mg·kg⁻¹对上述实验指标的影响差异无统计学意义,故在本实验中 EGCG 组只采用 40 mg·kg⁻¹给药剂量进行研究,探讨 EGCG 对心肌肥厚的影响及可能的作用机制,为心肌肥厚的预防和治疗提供新的手段和方法。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性 SD 大鼠,体重(200±20)g,40 只,购自重庆医科大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(渝)2012-0001。

1.2 药物及试剂 EGCG(纯度 95%,杭州禾田生物技术有限公司,批号 20121123S),野百合碱(monocrotaline, MCT,美国 Sigma 公司,批号 1202775),卡托普利片(上海长城药业有限公司,批号 20111216)。NO 检测试剂盒(批号 120216),IL-1 β 和 IL-6(批号 120324)均由南京建成生物工程研究所提供。

1.3 仪器 FA135S 型电子天平(上海精密仪器仪表有限公司),Sigma-3k30 型高速冷冻离心机(德国 Sartorius 公司),TECNAI10 型电镜(荷兰飞利浦公司),TU1810 型紫外-可见分光光度计(北京普析仪器有限责任公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立及给药 大鼠随机均分 4 组,正常组、模型组、阳性药卡托普利(25 mg·kg⁻¹)组和 EGCG(40 mg·kg⁻¹)组,每组 10 只。除正常组外各组大鼠于实验开始时单次 ip 2% MCT 60 mg·kg⁻¹制模,对照组则 ip 等容积生理盐水。24 h 后各组分别 ig 给药,正常组和模型组 ig 等体积生理盐水,每天 1 次,连续 21 d。

2.2 右室肥厚指数(RVHI)和右室质量指数(RVMI)的测定 第 21 天晚 ig 给药后,断头处死后

迅速取大鼠完整心脏,用预冷的生理盐水冲洗干净,去心房及大血管,分离右室(right ventricle, RV)游离壁和左室+室间隔(left ventricle+septum, LV+S)。滤纸蘸干后称重,计算右室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI) = RV/(LV+S),右室质量指数(RVMI) = RVW/BW^[2]。

2.3 右室心肌细胞超微结构的观察 取新鲜右室心肌组织约 1 mm³,2.5%戊二醛固定→0.1 mol·L⁻¹ PBS 漂洗 2 次,10 min/次→1%锇酸后固定 2 h→丙酮梯度脱水→环氧树脂 618 包埋→半薄切片定位→超薄切片,铀染,铅染→荷兰飞利浦 TECNAI10 电镜观察。

2.4 大鼠右室心肌组织 NO 和 iNOS 检测 取新鲜右室心肌组织,按照组织 NO 检测试剂盒说明书,用硝酸还原酶特异地将 NO³⁻还原为 NO²⁻。通过检测血清 NO³⁻和 NO²⁻之和反应体内 NO 水平,使用波长 540 nm 比色测定,分别读取测定管和标准管的吸光度 A,按下式计算:测定管 A 标准管 A × 100 = 标本 NO 含量(μmol·L⁻¹)。采用血红蛋白氧化法测定,组织匀浆上清液在 37℃,紫外分光光度仪在 401 nm 至 421 nm 波长测 A(代表 iNOS 含量)。

2.5 大鼠右室心肌组织 IL-1 β 和 IL-6 检测 大鼠断头处死,取右室心肌组织,预冷的 PBS 冲洗后滤纸吸干,称重,剪碎后,加入 PBS 液,PBS 体积是组织质量的 9 倍,冰磨 2 min 至不见组织碎块,4℃,3 000 r·min⁻¹,离心 15 min 取上清,采用 BCA 法测定蛋白含量,-80℃液氮保存。将样品各 4 μL 加入待测样品孔,ELISA 试剂盒严格按说明操作,37℃避光反应 10 min 加入终止液,测定 IL-1 β 和 IL-6 的 A,根据制备的标准曲线计算 IL-1 β 及 IL-6 的含量。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MCT 诱导右室肥厚大鼠 RVHI 和 RVMI 的影响 模型组 RVHI 和 RVMI 明显高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.05$);EGCG 组和卡托普利组 RVHI 和 RVMI 明显降低,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 对 MCT 处理大鼠右室心肌细胞超微结构的影响 电镜下观察正常组心肌肌丝排列整齐,肌节各带结构清晰,肌丝间线粒体丰富,线粒体嵴密集,细胞核(N)呈卵圆形,边缘光滑。模型组心肌组织出

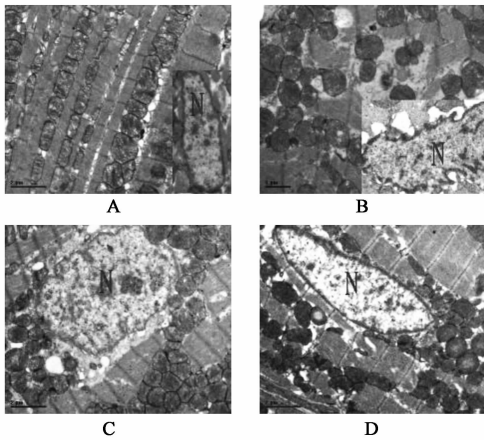
表 1 EGCG 对 MCT 诱导右心室肥厚大鼠 RVHI 和 RVMI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of EGCG on RVHI and RVMI levels in rats induced by MCT ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	RVHI /g·g ⁻¹	RVMI × 10 ⁻⁴ /g·g ⁻¹
正常	-	0.26 ± 0.02	6.46 ± 0.39
模型	-	0.34 ± 0.04 ¹⁾	9.02 ± 0.87 ¹⁾
EGCG	40	0.28 ± 0.03 ²⁾	7.21 ± 0.39 ²⁾
卡托普利	25	0.27 ± 0.03 ²⁾	7.32 ± 0.92 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 ~ 3 同)。

现闰盘中断,肌丝稀疏,灶性溶解,并出现空白水肿,线粒体增生,肿胀变形,嵴排列紊乱,细胞核(N)大,核形不规则,核膜凹凸明显,呈锯齿状。卡托普利组肌丝排列尚可,线粒体轻度肥大,细胞核基本正常。EGCG 组心肌的损伤明显减轻,肌丝排列整齐,线粒体轻度肥大,细胞核(N)呈卵圆形,边缘光滑;膜结构发育良好。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 卡托普利 25 mg·kg⁻¹ 组; D. EGCG 40 mg·kg⁻¹ 组

图 1 EGCG 对 MCT 处理大鼠右心室心肌细胞超微结构的影响 (HE, × 12 000)

Fig. 1 Effects of EGCG on ultrastructure of right ventricular hypertrophy myocardium tissue induced by MCT (HE, × 12 000)

3.3 对右室心肌组织 NO 和 iNOS 蛋白表达的影响

模型组右室心肌组织细胞 NO 和 iNOS 蛋白表达明显高于正常组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); EGCG 组和卡托普利组右室心肌组织细胞 NO 和 iNOS 蛋白表达明显降低,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 对右室心肌细胞 IL-1 β 和 IL-6 蛋白表达的影响

模型组右室心肌组织细胞 IL-1 β 和 IL-6 蛋白表

表 2 EGCG 对 MCT 诱导右心室肥厚大鼠心肌组织 NO 和 iNOS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of EGCG on NO and iNOS levels of right ventricular hypertrophy myocardium tissue induced by MCT ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NO/nmol·g ⁻¹	iNOS/U·mg ⁻¹
正常	-	11.43 ± 0.65	13.06 ± 1.32
模型	-	17.59 ± 2.74 ¹⁾	21.76 ± 3.47 ¹⁾
EGCG	40	11.94 ± 0.85 ²⁾	14.69 ± 1.78 ²⁾
卡托普利	25	12.47 ± 0.75 ²⁾	15.72 ± 1.48 ²⁾

达明显高于正常组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); EGCG 组和卡托普利组右室心肌组织细胞 IL-1 β 和 IL-6 的表达水平明显降低,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 EGCG 对 MCT 诱导右心室肥厚大鼠心肌组织 IL-1 β 和 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of EGCG on IL-1 β and IL-6 levels of right ventricular hypertrophy myocardium tissue induced by MCT ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-1 β /ng·g ⁻¹	IL-6/ng·g ⁻¹
正常	-	3.04 ± 0.97	26.94 ± 8.06
模型	-	4.94 ± 0.78 ¹⁾	38.65 ± 9.45 ¹⁾
EGCG	40	3.47 ± 0.86 ²⁾	28.55 ± 9.05 ²⁾
卡托普利	25	3.51 ± 0.79 ²⁾	29.69 ± 8.91 ²⁾

4 讨论

心肌肥厚导致心力衰竭在各种心血管疾病中的死亡率占居首位^[3-4],对心肌肥厚发生机制的探讨并寻找有效的干预措施,具有临床意义。本实验建立了大鼠 MCT 右室肥厚模型,观察探讨了 EGCG 防治大鼠心肌肥厚的效果及作用机制。野百合提取所得吡咯烷生物碱 MCT,可在大鼠体内转化为野百合吡咯损伤肺血管内皮细胞,进而引起肺动脉平滑肌细胞进行性增殖,导致肺动脉高压继发右室肥厚^[5]。MCT 右室肥厚大鼠模型被广泛用于模拟非原发于心脏的右室肥厚和心力衰竭的研究^[6-7]。本次研究结果显示:大鼠单次腹腔注射 MCT 60 mg·kg⁻¹ 18 d 后, RVHI, RVMI 均明显高于正常组;形态学观察显示模型组大鼠右室心肌组织出现了心肌肥厚的病理改变,证明大鼠右心室肥厚模型建立成功。通过 EGCG 预防性灌胃 21 d 后,大鼠 RVHI, RVMI 明显降低,与模型组比较有显著差异,右室心肌形态学接近正常,表明 EGCG 能有效对抗 MCT 对大鼠右室心肌的损伤。

心肌中的 NOS 是合成 NO 的限速酶, eNOS 产

生的 NO 有心肌保护作用, iNOS 表达能诱导产生过量 NO 加重心肌损伤^[8]。本实验模型组右室心肌中 iNOS 蛋白表达上调, NO 含量明显增加, 提示大鼠右室增厚与 iNOS 表达增多及 NO 过多释放相关。生理情况下, 心肌组织 IL-1 β 少量表达, 在心肌受到损伤、氧化应激等作用下, 心肌细胞分泌大量 IL-1 β , 局部异常表达的 IL-1 β 不适当堆积可促使心肌纤维化, 导致心肌增厚。而 IL-1 β 和 IL-6 可以引起心肌细胞蛋白质合成增加^[9], 激活心房利钠多肽 (ANP) 及 β -肌球蛋白重链 (β -MHC) 的表达^[10], 临床上以 IL-1 β 和 IL-6 的水平高低来判断心肌损伤程度^[11]。本实验模型组右室心肌中 IL-1 β 和 IL-6 蛋白表达明显增高, 提示大鼠右室增厚与心肌炎性损伤有关。

综上所述, ECGG 可通过抑制大鼠右室心肌组织 NO, IL-1 β 和 IL-6 等细胞因子的释放, 调控组织的炎症损伤反应, 改变组织病理状态。对于 ECGG 抗心肌肥厚的作用是否还有其他作用途径, 有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] 李叶云, 江昌俊, 王秀丽. 茶多酚的生物活性及药理学研究进展[J]. 安徽中医学院学报, 2002, 21(5): 57-58.

[2] Shinichi K, Yi-jen L, Paul C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats[J]. Circulation, 2001, 104(21): 945-950.

[3] Kannel W B. Vital epidemiologic clues in heart failure

[J]. Clin Epidemiol, 2000, 53(3): 229-235.

[4] Hobbs R E. Guidelines for the diagnosis and management of heart failure[J]. A J Ther, 2004, 11: 467-472.

[5] Brown L, Miller J, Dagger A, et al. Cardiac and vascular responses after monocrotaline-induced hypertrophy in rats[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1998, 31(1): 108-115.

[6] Kogler H, Hartmann O, Leineweber K, et al. mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline induced right ventricular hypertrophy in the rat[J]. Circ Res, 2003, 93(3): 230-237.

[7] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1030-1032.

[8] 王卉, 王继厂, 施睿臻, 等. 依那普利和厄贝沙坦对去势后大鼠心肌肥厚一氧化氮和一氧化氮合酶的影响[J]. 医学研究生学报, 2010, 7(7): 686-689.

[9] Tanaka T, Kanda T, Takahashi T, et al. Interleukin-6 induced reciprocal expression of SERCA and natriuretic peptides mRNA in cultured rat ventricular myocytes[J]. J Int Med Res, 2004, 32(1): 57-61.

[10] Tanaka T, Kanda T, Itoh T, et al. Increased cardiac weight in interleukin-6 transgenic mice with viral infection accompanies impaired expression of natriuretic peptide genes[J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 2001, 110(56): 275-283.

[11] Rana Al Sadi, Gun Shu Hong, Ye Dong Mei, et al. Mechanism of IL-1 β modulation of intestinal epithelial barrier involves p38 kinase and activating transcription factor-2 activation[J]. J Immunol, 2013, 190(13): 1-5.

[责任编辑 周冰冰]