

EGCG 抗糖尿病心肌病小鼠心肌组织中氧化应激 损伤作用机制的探讨

任仲坤¹, 张志毕², 刘艳红², 张荣平², 杨晖^{2*}

(1. 昆明医科大学 生物医学工程研究中心, 昆明 650500; 2. 昆明医科大学 第一附属医院, 昆明 650032)

[摘要] 目的:探讨儿茶素没食子酸酯(EGCG)对糖尿病小鼠高糖诱导的心肌组织氧化应激损伤的影响。方法:采用雄性 C57 小鼠给予高糖高脂饮食 6 周后,按 $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的标准腹腔注射链脲佐菌素(STZ),连续 5 d。空腹血糖(FBG) $> 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 视为造模成功。后随机分为空白组,模型组,EGCG 低、中、高剂量组($50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),*N*-乙酰半胱氨酸(NAC, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,腹腔注射,隔天 1 次,连续 4 周。分别测定小鼠体重、心脏质量、心脏质量指数、血糖值;镜下观察心肌细胞及组织病理变化;酶联免疫吸附法(ELISA)检测心肌组织活性氧(ROS),超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA)及炎症因子白细胞介素(IL)- 1β , IL-6, 肿瘤坏死因子(TNF)- α 的含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)测定心肌组织中 NF-E2 相关因子 2(Nrf2)介导的抗氧化通路中血红素氧合酶-1(HO-1)和醌氧化还原酶 1(NQO1)的表达。结果:与模型组相比,EGCG ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组能一定程度降低血清中的 FBG 水平($P < 0.05$);抑制心肌细胞肥大及心肌组织纤维化程度,增强 SOD 活性,降低 MDA,ROS 含量($P < 0.05$);降低组织中炎症因子 IL- 1β , IL-6, TNF- α 的含量($P < 0.05$);激活心肌细胞核内 Nrf2 介导的抗氧化通路,作用优于强抗氧化剂 NAC。结论:EGCG 对高糖诱导的心肌细胞损伤具有保护作用,其机制可能与 EGCG 的抗氧化应激、抗炎作用有关。

[关键词] 儿茶素没食子酸酯;链脲佐菌素;糖尿病心肌病;活性氧;超氧化物歧化酶;丙二醛;白细胞介素;肿瘤坏死因子- α ;核转录因子相关因子 2

[中图分类号] R22;R24;R256.2;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0148-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030148

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171114.1152.034.html>

[网络出版时间] 2017-11-14 11:52

Anti-inflammatory and Anti-oxidative Stress Damage of Catechin Gallate on Diabetic Myocardial in C57 Mice

REN Zhong-kun¹, ZHANG Zhi-bi², LIU Yan-hong², ZHANG Rong-ping², YANG Hui^{2*}

(1. Biomedical Engineering Research Center, Kunming medical University, Kunming 650500, China;

2. The First Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect of catechin gallate (EGCG) on diabetic myocardial injury in C57 mice. **Method:** The diabetic cardiomyopathy injury model in C57 mice was induced by injected with streptozocin (STZ, $70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and provided with high-diet food. The DCM mice were randomly divided into 6 groups, namely blank group, model group, EGCG group ($50, 100, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and *N*-acetyl-*L*-cysteine (NAC) group ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Each group was put to death on the 14th day after intraperitoneal injection. The level of fasting blood-glucose (FBG) was detected by kit; reactive oxygen (ROS), malondialdehyde

[收稿日期] 20170807(004)

[基金项目] 云南省教育厅指导性项目(2017ZDX157);云南省科技厅-昆明医科大学联合专项(2015FB010);南药协同创新项目(2011);昆明医科大学本科生创新项目

[第一作者] 任仲坤,博士,主治医师,从事心脑血管药理研究,Tel:0871-65922934,E-mail:358900939@qq.com

[通信作者] *杨晖,博士,讲师,从事心血管药理研究,Tel:0871-65922934,E-mail:yanghuirzx@126.com

(MDA), superoxide dismutase (SOD), internukin (IL) -1β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF) $-\alpha$ were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit. Myocardial pathological changes of cardiomyopathy injury were observed under microscope; Nrf2 and HO-1, NQO1 protein kinases were detected by Western blot. **Result:** Compared with the model group, EGCG ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) can decrease the level of FBG in DCM C57 mice and inhibit the activities of IL- 1β , IL-6, MDA, ROS in cardiac muscle tissues ($P < 0.05$); increase the activity of SOD in cardiac muscle tissues ($P < 0.05$); increase the expression of protein kinase of Nrf2, HO-1, NQO1 in cardiac muscle tissues ($P < 0.05$). Moreover, EGCG ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) can restrain the cardiomyocyte hypertrophy and interstitial fibrosis apparently in cardiac muscular tissues. The findings showed that EGCG was better than NAC. **Conclusion:** EGCG has a protective effect on diabetic cardiomyopathy in C57 mice. The mechanism may be correlated with its anti-inflammatory and anti-oxidative stress damage action.

[**Key words**] catechin gallate; streptozocin; diabetic cardiomyopathy; reactive oxygen species; superoxide dismutase; malondialdehyde; internukin; tumor necrosis factor- α ; NF-E2-related factor 2

糖尿病心脏病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 是糖尿病患者致死的主要原因, 最终表现为心力衰竭, 心源性休克及猝死^[1]。DCM 发病机制复杂, 其中氧化应激及炎症反应是导致心肌细胞损伤, 心肌间质纤维化, 最终心功能障碍的主要原因, 目前国内并无针对性强的抗氧化应激损伤的药物或者手段来治疗 DCM, 临床多用营养心肌的药物来缓解 DCM 患者的症状, 但效果并不明显。因此目前抗氧化应激药物在 DCM 中的研发治疗成为了一个新的研究方向^[2]。DCM 患者的心肌组织会释放大量的活性氧 (ROS), 向细胞核内转运并与 DNA 紧密结合, 激活核转录因子 (NF)-E2 相关因子 2 (Nrf2), 启动下游因子血红素氧合酶-1 (HO-1) 和醌氧化还原酶 1 (NQO1) 的表达起到保护心肌细胞作用^[3]。同时, 被激活的 Nrf2 能上调诸如肿瘤坏死因子 (TNF)- α , 白细胞介素 (IL)- 1β , IL-6 等多种炎症介质直接参与组织损伤。在这一病变过程中, Nrf2 被氧化产物激活同时又产生氧化产物, 形成了一个产生 ROS 的回路反复对心肌组织造成损伤^[4-5]。

近年来有研究表明抗氧化应激反应能有效减缓糖尿病心脏病的损伤^[6]。因此抗氧化药物的应用成为治疗 DCM 的思路与方法。儿茶素没食子酸酯 (catechin gallate, EGCG) 来源于绿茶, 有研究表明 EGCG 具有极强的抗氧化性, 能够抑制糖尿病小鼠心肌的缺血再灌注损伤中的氧化应激反应^[7], 但 EGCG 对高糖诱导 DCM 的影响及作用机制国内外尚未有报道。B 细胞特异性的 Nrf2 获得/缺失实验证实了 Nrf2 能够保护胰岛 B 细胞的氧化应激损伤^[8], 因此 Nrf2 是具有代表性的阻断糖尿病心脏病氧化应激损伤的靶点蛋白。本课题通过 EGCG 对 Nrf2 介导的信号通路及相关炎症因子、氧化应激因

子表达的影响来探讨 EGCG 对高糖诱导 DCM 小鼠心肌的保护作用及相关机制, 为 EGCG 的在 DCM 的临床应用提供理论基础。

1 材料

1.1 动物 雄性 C57 小鼠, 体重 $18 \sim 22 \text{ g}$, 120 只, 购于北京维通利华动物实验技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2006-2009。实验动物的开展取得了昆明医科大学实验动物伦理委员会批准 (编号 KMMU-2015-011)。

1.2 药物与试剂 EGCG 由昆明医科大学药学院提供 (纯度为 98%, 批号 20160908); 链脲佐菌素 (货号 S0130, 纯度 99%), N-乙酰半胱氨酸 (NAC, 货号 A7250, 纯度 99%), ROS 测定试剂盒 (批号 MAK143) 均购自美国 Sigma 公司; 超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒 (批号 20160311), 丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (批号 20160501) 均购自南京建成生物制品有限公司; IL- 1β 测定试剂盒 (美国 Cayman 公司, 批号 583311-96); IL-6 测定试剂盒 (批号 LE-H5377); TNF- α 测定试剂盒 (批号 EM0830), 葡萄糖 (Gluconate) 测定试剂盒 (批号 D107) 均购自北京莱尔生物科技有限公司; 抗 Nrf2 抗体 (批号 ab62352), 抗 HO-1 抗体 (批号 ab133057), 抗 NQO1 抗体 (批号 ab28947) 均购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器 TU-1810DSPC 型紫外分光光度计 (北京普析通用有限公司); CKX31 型荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 164-5050 型电泳仪, 170-3930 湿转印槽, GelDoc XR 凝胶成像系统 (美国 Bio-rad 公司)。

2 方法

2.1 造模和分组 C57 小鼠以高糖高脂饲料连续喂养 6 周 (20% 蔗糖, 10% 猪油, 2.5% 胆固醇, 1% 胆盐和 66.5% 基础饲料)。6 周后, 小鼠禁食 12 h,

以 $70 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 标准腹腔注射链脲佐菌素 (STZ), 每天注射完毕后小鼠正常饮食水, 连续注射 $5 \text{ d}^{[9]}$ 。后测量小鼠空腹血糖, 空腹血糖 $>16.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诊断为糖尿病小鼠。将成模的糖尿病小鼠分为 5 组, 每组 10 只, 具体为模型组, EGCG 组 ($50, 100, 200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), NAC 组 ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

2.2 药物制备 STZ 溶于 pH 4.5, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的柠檬酸缓冲液中, 全程避光, 冰上配制; EGCG 溶于生理盐水中, 根据前期针对抗氧化应激指标的预实验结果得出 EGCG 的最佳有效剂量为 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 本实验中将 EGCG 配成低、中、高 ($50, 100, 200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 3 个剂量, 避光; NAC 为常用的抗氧化剂, 笔者将与 EGCG 的最佳有效剂量等浓度的 NAC 作为阳性药来参考评价 EGCG 的抗氧化作用, NAC 溶于生理盐水中, 配制成 $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度; STZ, NAC 与 EGCG 均现用现配。

2.3 给药 造模及分组完成后, 各组药物均腹腔注射, 模型组注射生理盐水, 隔天 1 次, 连续 4 周, 另选 10 只正常 C57 小鼠作为正常组。

2.4 标本的采集与处理 心脏质量、心脏质量指数 颈椎脱臼处死小鼠后迅速摘取其心脏, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 生理盐水冲洗, 滤纸吸干称重, 按心重/体重计算心脏指数 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)。

2.5 分离血清测血糖 给药结束后, 小鼠禁食 12 h, 各组小鼠眼内眦静脉取血, 分离血清, 测血糖备用。心脏: 取血后, 立即处死小鼠, 取其心脏, 用冰冻的生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 切心尖 $1/2$ 组织放于 10% 的甲醛溶液中固定, 剩余的心肌组织分装保存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱备用。

2.6 酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测心肌组织中各氧化应激指标、炎性因子的含量 各组小鼠心脏灌注后取 50 mg 心肌组织, 组织超声破碎机研磨成匀浆, 全程在冰上操作。组织匀浆制备好后按照试剂

盒说明书, 检测组织中 ROS, SOD 活力, MDA 值及炎性因子 IL- 1β , IL-6, TNF- α 的含量。

2.7 心肌细胞和心肌间质的观察 光镜下观察苏木素-伊红 (HE) 染色心肌细胞形态及结构改变; 马松 (Masson) 染色观察心肌间质纤维化程度。

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 测定心肌组织匀浆中 Nrf2 及其下游 HO-1, NQO1 的蛋白表达 蛋白提取定量后进行蛋白质印迹检测, 行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转移至 PVDF 膜上, 封闭, 依次加入一抗二抗, ECL 化学发光检测。Nrf2 ($1:500$) 和 HO-1 ($1:1000$), NQO1 ($1:1500$) 的表达, 以 β -肌动蛋白 (β -actin, $1:2000$) 为内参。蛋白质印迹经数次重复, 用凝胶图像分析仪扫描照片, 以灰度值比值表示各组的蛋白相对表达量。

2.9 统计学方法 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计学分析。方差齐性数据两组间比较时采用独立样本 t 检验; 多组数据比较时采用方差分析 (ANOVA), 当 ANOVA 显示有统计学差异时, 需要进一步做组间两两比较, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 EGCG 对 DCM 小鼠空腹血糖 (FBG), 体重 (BW), 心脏质量, 心脏质量指数的影响 给药第 1 周时, 各组小鼠 BW 比较无明显差异, FBG 值相比无明显差异, 心脏质量值相比无明显差异, 心脏质量指数比较无明显差异; 到给药第 4 周时, 与正常组比较, 模型组小鼠的体重明显下降, 心脏指数和血糖明显增高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, EGCG ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组, NAC 组小鼠体重增加, 心脏指数降低 ($P < 0.01$), FBG 降低 ($P < 0.05$), 且 EGCG ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组的作用优于 NAC 组 ($P < 0.05$)。EGCG 能一定程度的降低糖尿病心肌病小鼠的空腹血糖值, 降低心脏指数。见表 1。

表 1 EGCG 对糖尿病心肌病小鼠体重及空腹血糖、心脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of EGCG on BW, FGB and cardiac index in diabetic cardiomyopathy mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	给药第 1 周				给药第 4 周			
		体重 / g	血糖 / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	心脏重 / mg	心脏指数 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	体重 / g	血糖 / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	心脏重 / mg	心脏指数 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
正常	-	22.00 ± 2.35	7.33 ± 2.10	200.16 ± 12.33	9.09 ± 1.20	39.00 ± 3.01	7.15 ± 1.95	209.16 ± 13.71	5.35 ± 1.00
模型	-	25.33 ± 3.21	$21.55 \pm 4.05^{2)}$	$513.16 \pm 12.33^{2)}$	$20.05 \pm 2.00^{1)}$	$20.05 \pm 5.91^{1)}$	$31.05 \pm 5.91^{2)}$	$533.19 \pm 10.09^{2)}$	$26.65 \pm 2.07^{2)}$
EGCG	50	26.17 ± 4.05	$21.55 \pm 4.05^{2)}$	$511.103 \pm 11.02^{2)}$	$19.17 \pm 1.77^{1)}$	$20.05 \pm 5.91^{1)}$	$25.05 \pm 4.21^{2,3)}$	$492.71 \pm 16.61^{2,3)}$	$24.60 \pm 2.00^{2)}$
	100	22.13 ± 2.25	$23.15 \pm 5.11^{2)}$	$509.33 \pm 19.93^{2)}$	$22.32 \pm 2.01^{1)}$	$30.05 \pm 5.91^{1,3)}$	$16.79 \pm 5.00^{1,4)}$	$315.33 \pm 19.93^{1,4)}$	$13.16 \pm 1.11^{1,4)}$
	200	23.05 ± 6.01	$22.00 \pm 4.93^{2)}$	$512.16 \pm 17.00^{2)}$	$23.56 \pm 1.56^{1)}$	$27.05 \pm 5.91^{1,3)}$	$21.31 \pm 5.91^{2,3)}$	$447.16 \pm 17.00^{2,3)}$	$18.33 \pm 1.56^{1,3)}$
NAC	100	22.05 ± 5.32	$22.00 \pm 4.00^{2)}$	$509.16 \pm 15.21^{2)}$	$23.13 \pm 2.11^{1)}$	$26.15 \pm 6.53^{1,3)}$	$17.00 \pm 6.02^{1,4)}$	$358.02 \pm 16.93^{1,4)}$	$13.76 \pm 1.57^{1,4)}$

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.2 EGCG 对 DCM 小鼠心肌组织匀浆中 SOD, MDA, ROS 水平的影响 与正常组比较,模型组 SOD 活性明显降低 ($P < 0.01$),MDA,ROS 含量明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,EGCG

($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组及 NAC 组的 SOD 活性明显升高 ($P < 0.01$),MDA,ROS 含量明显降低 ($P < 0.01$)。EGCG 能增强 DCM 小鼠心肌组织抗氧化应激能力。见表 2。

表 2 EGCG 对糖尿病心肌病小鼠心肌组织中 SOD,MDA,ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of EGCG on SOD,MDA and ROS in cardiac muscle tissue in diabetic cardiomyopathy mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	SOD / $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ROS/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	139.80 ± 13.13	3.70 ± 0.11	131.05 ± 29.11
模型	-	61.80 ± 13.10 ²⁾	7.60 ± 0.09 ¹⁾	671.12 ± 22.15 ²⁾
EGCG	50	50.11 ± 10.39 ²⁾	9.21 ± 0.10 ^{2,3)}	509.07 ± 35.82 ^{2,3)}
	100	191.76 ± 10.08 ^{1,4)}	3.60 ± 0.11 ⁴⁾	281.16 ± 31.59 ^{1,4)}
	200	122.80 ± 12.12 ^{1,4)}	5.35 ± 0.07 ^{1,3)}	435.44 ± 28.73 ^{2,4)}
NAC	100	95.10 ± 13.45 ^{1,3)}	3.90 ± 0.11 ⁴⁾	319.75 ± 21.16 ^{2,3)}

3.3 EGCG 对糖尿病小鼠心肌组织匀浆中 IL-6, IL-1 β , TNF- α 的影响 与正常组比较,模型组的 IL-6, IL-1 β , TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.01$);与模型组比

较,EGCG ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,NAC 组的 IL-6, IL-1 β , TNF- α 水平明显降低 ($P < 0.01$)。EGCG 能增强 DCM 小鼠心肌组织抗炎性损伤能力。见表 3。

表 3 EGCG 对糖尿病小鼠心肌组织中 IL-6,IL-1 β , TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Influence of EGCG on IL-6,IL-1 β , TNF- α in cardiac muscle tissue in diabetic cardiomyopathy mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-6	IL-1 β	TNF- α
正常	-	21.80 ± 13.13	13.70 ± 2.11	131.05 ± 29.05
模型	-	81.80 ± 13.10 ²⁾	67.60 ± 2.09 ²⁾	671.11 ± 22.13 ²⁾
EGCG	50	60.11 ± 10.39 ^{2,4)}	59.21 ± 2.10 ²⁾	509.09 ± 35.31 ^{2,3)}
	100	31.76 ± 10.08 ^{1,4)}	24.60 ± 2.11 ^{1,4)}	215.07 ± 31.12 ^{1,4)}
	200	49.80 ± 12.12 ^{1,4)}	45.35 ± 2.07 ^{2,3)}	471.13 ± 28.11 ^{2,3)}
NAC	100	29.05 ± 11.00 ⁴⁾	30.01 ± 2.56 ^{2,3)}	228.36 ± 22.01 ^{1,4)}

3.4 EGCG 对 DCM 小鼠心肌细胞的影响 正常组小鼠心肌细胞形态正常,细胞间界限清晰。DCM 模型组小鼠心肌细胞出现核裂解以及核丢失现象,心肌细胞间界限不清,排列方式紊乱,疏松、细胞核形状不规则、肿胀、固缩或者消失,细胞质分布不均匀,溶解呈颗粒状间质出现炎细胞浸润。EGCG ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组以及 NAC 组小鼠心肌细胞核裂解以及核丢失现象较模型组均有不同程度的改善,作用明显优于 EGCG ($50, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组。EGCG 能有效保护心肌细胞损伤,作用与强抗氧化剂 NAC 组相当。见图 1。

($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组心肌组织纤维化程度最低,蓝染增粗的胶原纤维明显减少,EGCG ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及 EGCG ($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)不及 EGCG ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组作用明显。NAC 组 ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)心肌组织纤维化程度也明显降低,蓝染增粗的胶原纤维明显减少。EGCG 能有效保护心肌间质纤维化病变,作用与强抗氧化剂 NAC 组相当。见图 2。

3.5 EGCG 对 DCM 小鼠心肌间质的影响 正常组小鼠心肌纤维无增粗,排列整齐,无明显胶原纤维沉积,DCM 模型组小鼠心肌间质内有明显蓝染增粗的胶原纤维沉积,心肌纤维粗大,排列紊乱,EGCG 各组心肌组织纤维化程度不同程度降低,其中 EGCG

3.6 EGCG 对 DCM 小鼠心肌组织中 Nrf2 抗氧化通路的影响 正常组小鼠心肌组织中 Nrf2 的表达弱,模型组与正常组相比轻度增加 ($P < 0.05$);EGCG ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组小鼠心肌组织中 Nrf2 核蛋白的表达与正常组相比明显增加 ($P < 0.01$);较模型组也明显增加 ($P < 0.01$),且抗氧化蛋白 HO-1 与 NQO1 的表达显著上调,与正常组与模型组相比差异明显 ($P < 0.01$)。实验结果表明,高糖诱导的 DCM 小鼠心肌损伤能够轻度激活心肌组织中 Nrf2 的蛋白表

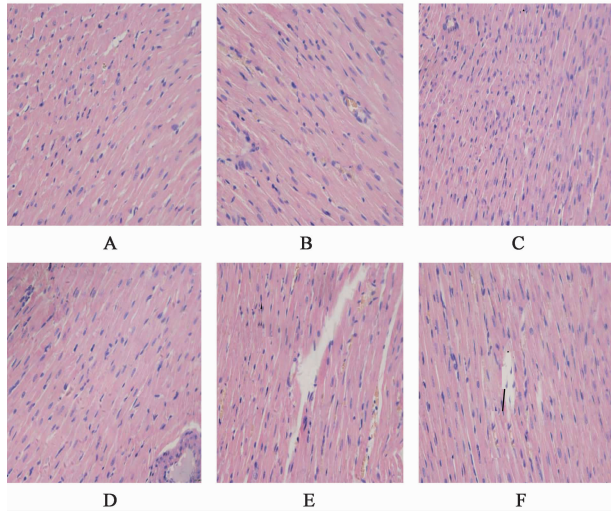


图 1 EGCG 对 DCM 小鼠心肌细胞的影响 (HE, ×200)
A. 正常组; B. 模型组; C. EGCG (50 mg·kg⁻¹) 组; D. EGCG (100 mg·kg⁻¹) 组; E. EGCG (200 mg·kg⁻¹) 组; F. NAC (100 mg·kg⁻¹) 组 (图 2, 3 同)

图 1 EGCG 对 DCM 小鼠心肌细胞的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effect of EGCG on pathology of myocardial cell (HE, ×200)

达; 而 EGCG (100 mg·kg⁻¹) 处理后能够显著激活心肌组织中 Nrf2 蛋白表达及下游蛋白 HO-1 与 NQO1 的表达, 作用优于 EGCG (50, 200 mg·kg⁻¹) 组及强抗氧化剂 NAC 组 ($P < 0.05$), 增强心肌的抗氧化能力。EGCG 具有强抗氧化能力, 作用优于 NAC。见图 3, 表 4。

4 讨论

随着世界范围内糖尿病的高发病率及高致死

表 4 EGCG 对 DCM 小鼠心肌组织中 Nrf2, HO-1 与 NQO1 的表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of EGCG on expression of Nrf2, HO-1 and NQO1 in myocardial nuclear ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin	NQO1/β-actin
正常	-	0.28 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.50 ± 0.10
模型	-	0.59 ± 0.08 ¹⁾	0.30 ± 0.85 ¹⁾	0.71 ± 0.07
EGCG	50	0.84 ± 0.05 ^{1,3)}	0.45 ± 0.05 ¹⁾	0.88 ± 0.08 ¹⁾
	100	1.30 ± 0.08 ^{2,4)}	1.10 ± 0.11 ^{2,4)}	1.58 ± 0.07 ^{2,4)}
	200	0.86 ± 0.04 ^{1,3)}	0.75 ± 0.05 ^{2,3)}	1.03 ± 0.05 ^{1,3)}
NAC	100	1.01 ± 0.06 ^{2,4)}	0.88 ± 0.08 ^{2,3)}	0.91 ± 0.07 ¹⁾

率, 糖尿病及其相关病发症的预防治疗已成为研究热点^[10]。有研究表明, 氧化应激及炎症反应在糖尿病病心肌病的心肌损伤中起主要作用^[11]。

糖尿病心肌病小鼠的心肌细胞或组织能释放大量的 ROS, ROS 直接作用于细胞内的 DNA, 造成不可逆性氧化修饰, 导致心肌细胞外胶原沉积和细胞间质成分增加, 促进结缔组织增生^[12]。MDA 是氧自由基对不饱和脂肪酸引发的脂质过氧化作用的终产物, 其含量高低可反映机体内脂质过氧化程度, 并间

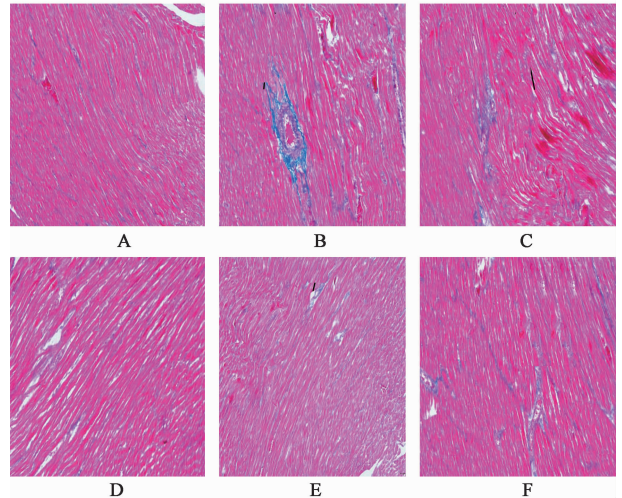


图 2 EGCG 对 DCM 小鼠心肌间质的影响 (Masson, ×200)

Fig. 2 Effect of EGCG on myocardial fibrosis in DCM mice (Masson, ×200)

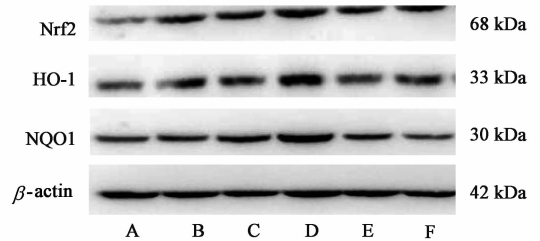


图 3 EGCG 对抗氧化蛋白 Nrf2 及抗氧化蛋白 HO-1 与 NQO1 在心肌细胞核内表达的影响

Fig. 3 Effect of EGCG on expression of Nrf2, HO-1 and NQO1 in myocardial nuclear

接反映氧自由基对细胞损伤程度的指标。SOD 是体内重要的抗氧化酶, 具有减少脂质过氧化物形成、保护生物膜及生物大分子结构的功能^[13]。本实验结果表明, 糖尿病心肌病小鼠心肌组织中 SOD 活性降低, MDA 含量升高, ROS 释放增加, 而 EGCG 能够降低心肌组织中 MDA 含量和抑制 ROS 的释放, 增加 SOD 活性, 这与文献报道结果一致, 其中 EGCG (100 mg·kg⁻¹) 组为最佳剂量组, 效果优于 EGCG (50 mg·kg⁻¹) 组和 EGCG (200 mg·kg⁻¹) 组。提示

糖尿病心肌病小鼠心肌组织的氧化应激水平升高, 而 EGCG 能够降低糖尿病心肌病小鼠的心肌组织的氧化应激水平。且作用优于强抗氧化剂 NAC。

Nrf2 通过与核内相关蛋白相互作用调节抗氧化蛋白的表达, 催化氧自由基转变为无毒物质或增加其水溶性而有利于排除, 从而维持机体氧化还原平衡^[14], 因此, Nrf2 抗氧化应激反应通路是细胞最主要的抵御氧化应激产生的细胞毒性作用的途径。当机体处于氧化应激条件下, 大量 ROS 被释放, ROS 能激活 Nrf2 磷酸化, 继而启动 HO-1, NQO1 基因的转录及高效表达, 保护机体免受损伤。Nrf2 几乎参与调控机体所有炎症介质转录, Nrf2 激活后能上调诸如 TNF- α , IL-1 β , IL-6 等的表达, 直接导致细胞与组织损伤, 心肌肥厚、心脏功能降低、心肌纤维化、心肌组织病理性重构等^[15]。

在本实验中, 笔者发现 DCM 模型组小鼠心肌组织中 Nrf2 表达有所增加, 下游因子 HO-1, NQO1 的表达也轻微增加, 这与文献报道一致。在给予 EGCG 处理后, EGCG 能降低糖尿病心肌病小鼠心肌组织中 TNF- α , IL-1 β , IL-6 的含量, 减轻心肌组织的炎性损伤, 同时抑制 ROS 的释放增加, 反馈性激活 Nrf2 通路, 心肌组织中 Nrf2 大量表达, 同时上调抗氧化蛋白 HO-1 和 NQO1 的表达, 提高了机体抗氧化应激能力, 从而保护高糖诱导的心肌细胞损伤及心肌间质纤维化病变。

综上所述, EGCG 能有效改善糖尿病小鼠高糖诱导的心肌细胞损伤及间质纤维化, 其作用机制与 EGCG 的强抗氧化能力及启动 Nrf2 介导的内源性的抗氧化信号通路, 抑制炎症因子改善心肌间质纤维化有关。

[参考文献]

[1] WANG S, WANG B, WANG Y, et al. Zinc prevents the development of diabetic cardiomyopathy in *db/db* mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3):30274-30275.

[2] WU H, SHENG Z Q, XIE J, et al. Reduced HMGB 1-mediated pathway and oxidative stress in resveratrol-treated diabetic mice: a possible mechanism of cardioprotection of resveratrol in diabetes mellitus[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 20(16):9836-9860.

[3] Camacho P, FAN H, LIU Z, et al. Small mammalian animal models of heart disease[J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2016, 6(3):70-80.

[4] WU B, LIN J, LUO J, et al. Dihydromyricetin protects against diabetic cardiomyopathy in streptozotocin-

induced diabetic mice[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 5(21):4370-4376.

[5] LIU H J, FAN Y L, LIAO H H, et al. Apigenin alleviates STZ-induced diabetic cardiomyopathy[J]. *Mol Cell Biochem*, 2017, 428(1):9-21.

[6] Kalfon R, Koren L, Aviram S, et al. ATF3 expression in cardiomyocytes preserves homeostasis in the heart and controls peripheral glucose tolerance[J]. *Cardiovasc Res*, 2017, 113(2):134-146.

[7] YANG X H, PAN Y, ZHAN X L, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates renal damage by suppressing oxidative stress in diabetic *db/db* mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 16(2016):296-462.

[8] ZHANG Z, WANG S, ZHOU S, et al. Sulforaphane prevents the development of cardiomyopathy in type 2 diabetic mice probably by reversing oxidative stress-induced inhibition of LKB1/AMPK pathway[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 77(2):42-52.

[9] BAI D, ZHANG Y, SHEN M, et al. Hyperglycemia and hyperlipidemia blunts the Insulin-Inpp5f negative feedback loop in the diabetic heart[J]. *Sci Rep*, 2016, 24(6):22-68.

[10] Gollapudi S K, Tardiff J C, Chandra M. The functional effect of dilated cardiomyopathy mutation (R144W) in mouse cardiac troponin T is differently affected by α - and β -myosin heavy chain isoforms[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 308(8):884-893.

[11] LIN Y, TANG Y, WANG F. The protective effect of HIF-1 α in T lymphocytes on cardiac damage in diabetic mice[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2016, 46(1):32-43.

[12] Ramírez S, Gómez-Valadés A G, Schneeberger M, et al. Mitochondrial dynamics mediated by mitofusin 1 is required for POMC neuron glucose-sensing and insulin release control[J]. *Cell Metab*, 2017, 25(6):1390-1399.

[13] SHE F, SUN W, MAO J M, et al. Calcitonin gene-related peptide gene therapy suppresses reactive oxygen species in the pancreas and prevents mice from autoimmune diabetes[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2003, 55(6):625-632.

[14] Shadman A, Bastani B. Kidney calculi: pathophysiology and as a systemic disorder[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2017, 11(3):180-191.

[15] ZHOU S, JIN J, BAI T, et al. Potential drugs which activate nuclear factor E2-related factor 2 signaling to prevent diabetic cardiovascular complications: A focus on fumaric acid esters[J]. *Life Sci*, 2015, 1(134):56-62.