

表没食子儿茶素没食子酸酯对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用

胡宗礼(韶关学院生物工程系,广东 韶关 512005)

摘要:目的 观察表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。方法 结扎左冠状动脉前降支30mm再灌注60min复制大鼠心肌缺血再灌注模型,实验分假手术组、缺血再灌注组(IR)、EGCG₁(10mg·kg⁻¹)、EGCG₂(20mg·kg⁻¹)和丹参(SM,1.0g·kg⁻¹)治疗组。用心功能分析系统测定左室心功能,按试剂盒说明测定血浆SOD,MDA,LDH和CK水平,用TUNEL法检测凋亡细胞,SABC免疫组化法检测凋亡相关基因bcl-2与bax的蛋白表达。结果 ①缺血再灌注期间,IR组大鼠左室LVSP,±dp/dt_{max}呈进行性下降,LVEDP则进行性升高(与假手术组比, $P<0.01$),EGCG组虽有相似的变化趋势,但明显较缓(与IR组比, $P<0.01$)。②IR组大鼠血浆SOD水平显著降低;MDA,LDH与CK水平显著升高。EGCG组SOD水平则明显升高;MDA,LDH与CK水平明显降低($P<0.01$)。③IR组心肌凋亡细胞明显,bcl-2与bax蛋白表达增多,bcl-2/bax值下降;EGCG组凋亡细胞减少,bcl-2蛋白表达显著增多,bax则明显减少,bcl-2/bax值升高($P<0.01$)。结论 EGCG通过提高机体清除自由基能力减轻心肌细胞损伤和抑制心肌细胞凋亡而改善心功能,对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用。

关键词:表没食子儿茶素没食子酸酯;心肌缺血再灌注损伤;保护作用

中图分类号:R965 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2005)06-0442-04

The protective role of epigallocatechin gallate on myocardial ischemia reperfusion injury in rats

HU Zong-li(Faculty of Bioengineering,Shaoguan University,Shaoguan 512005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the protective effect of epigallocatechin gallate(EGCG) on myocardial ischemia reperfusion injury in rats. **METHODS** The left anterior descending branch of coronary artery was ligated for 30min and reperused 60min to make the myocardial ischemia reperfusion model in rats. 50 male wistar rats were averagely divided into five groups sham, ischemia reperfusion (IR), treated with EGCG(10mg/kg and 20mg/kg) and saliva milfiorrhizae(SM, 1. og/kg). The left cardiac function was measured by the analysis system. The levels of SOD,MDA,LDH and CK in plasma were measured according to the directions of reagent box. The apoptosis cardiomyocyte was shown by TUNEL method, and the expression of bcl-2 and bax were shown by immunohistochemtrial method. **RESULTS** Compared with the sham group, the left cardiac function was decreased during myocardial ischemia reperfusion ($P<0.01$), the level of SOD in plasma was decreased, while the levels of MDA,LDH and CK were increased in IR group ($P<0.01$), however, the changes above were significantly improved in EGCG group ($P<0.01$). There were many apoptosis cardiomyocytes in IR group, and the expression of bcl-2 and bax were increased, the ratio of bcl-2/bax reduced. But in EGCG group, the apoptosis and the expression of bax were less, the expression of bcl-2 was higher than IR group, and the ratio of bcl-2/bax was obviously risen. **CONCLUSION** EGCG can enhance the ability of inhibiting myocardial lipid peroxidation to alleviate myocardial injury, inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function.

KEY WORDS: epigallocatechin gallate; myocardial ischemia reperfusion injury; protective effect

实验与临床研究均已表明,心肌缺血再灌注(myocardial ischemia reperfiasion, MIR)时由于自由基的聚集以及自由基介导的脂质过氧化反应和细胞内钙超载,可进一步加重心肌的损伤——缺血-再灌注损伤,表现为心功能障碍、致命的心律失常等。近来的研究发现细胞凋亡在心肌缺血再灌注损伤中起重要作用^[1,2]。茶叶是我国传统饮品,富含茶多酚类化合物,表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是其中成分之一。已有的研究显示,茶多酚通过抗脂质过氧化对大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,并且EGCG可诱导肿瘤细胞凋亡而具有抗肿瘤作用^[3],本实验将进一步观察EGCG对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性Wistar大鼠,体重200~250g,由广州军区陆军总医院实验动物中心提供。

1.2 主要药品与试剂

EGCG:美国Sigma公司产品,纯度95%,用双蒸水配制成浓度为2%的溶液;丹参(salviae multiorrhizae, SM)注射液:江苏常熟制药厂产品,1g:1mL,批号:9701241;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒:南京聚力生物医学工程研究所;原位细胞凋亡检测试剂盒及bcl-2, bax免疫组化检测试剂盒:武汉

1.3 主要仪器

ECG-6511 型心电图机:上海光电医用电子仪器有限公司;DH-140 型动物人工呼吸机:浙江医科大学医学仪器实验厂;UV-754 紫外可见分光光度计:上海第三分析仪器厂;SMUP—PC 生物信号放大系统:上海医科大学生产;光学显微照相系统:日本 OLYMPUS 公司产品;IBAS 型全自动图像处理系统:德国 IBAS 公司产品。

1.4 大鼠心肌缺血再灌注模型的制备^[4]

参照文献采用结扎左冠状动脉前降支(LAD)30min 后松开灌注 60min 的方法建立心肌缺血再灌注模型。Wistar 大鼠用 3% 戊巴比妥钠 30mg/kg (1mL/kg)腹腔注射麻醉、固定,银针电极插于四肢皮下,接心电图机监测标准肢体 II 导联心电图,心电图不正常者弃去。行气管插管,接动物人工呼吸机正压呼吸(频率 55 ~ 60 次/分,潮气量 5mL/100g)。分离右颈总动脉作左心室插管^[5],导管另一端经压力换能器与 SMUP-PC 生物放大器及计算机相连接。开胸、暴露心脏,以肺静脉圆锥与左心耳交界处的左冠状动脉为标志,用 4/0 连线圆针于左心耳下缘 2mm 处进针,穿过 LAD 及浅层心肌备用,稳定 30min 后进行实验。

1.5 实验分组

Wistar 大鼠分为 5 组,每组 10 只。①假手术组(sham),LAD 只穿线不结扎,舌下静脉注射生理盐水 0.1mL/100g,旷置 90min;②缺血再灌注组(ischemia/reperfusion,IR):舌下静脉注射生理盐水(0.1mL/100g)后结扎 LAD,30min 后松开结扎线,再灌注 60min 后处死动物;③ EGCG 小剂量组(EGCG₁):舌下静脉注射 EGCG 10mg/kg(浓度 1%,0.1mL/100g),余同②组;④EGCG 大剂量组(EGCG₂):舌下静脉注射 EGCG 20mg/kg(浓度 2%,0.1mL/100g),余同②组;⑤丹

表 1 EGCG 对 MIR 大鼠左心功能的影响(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of EGCG on left cardiac function in rats during myocardial ischemia reperfusion(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

	Group	LVSP(kPa)	+ dp/dt _{max} (kPa/s)	LVEDP(kPa)	+ dp/dt _{max} (kPa/s)
缺血前	sham	14.46 ± 0.69	672.67 ± 56.73	0.51 ± 0.14	451.93 ± 39.44
	IR	14.38 ± 1.36	674.09 ± 48.93	0.52 ± 0.11	438.74 ± 39.29
	EGCG ₁	14.66 ± 0.72	688.43 ± 47.66	0.48 ± 0.10	466.33 ± 31.46
	EGCG ₂	14.92 ± 0.64	696.75 ± 52.64	0.39 ± 0.11	487.62 ± 29.07
	SM	14.58 ± 0.61	685.17 ± 33.38	0.53 ± 0.10	452.97 ± 27.11
缺血末	sham	14.39 ± 0.62	654.84 ± 57.14	0.50 ± 0.13	434.89 ± 29.40
	IR	12.75 ± 0.82 ¹⁾	478.23 ± 55.39 ¹⁾	1.83 ± 0.21 ¹⁾	299.41 ± 28.34 ¹⁾
	EGCG ₁	14.21 ± 0.70 ²⁾	597.73 ± 45.64 ²⁾	1.14 ± 0.18 ²⁾	388.42 ± 24.37 ²⁾
	EGCG ₂	14.36 ± 0.76 ²⁾	609.72 ± 40.19 ²⁾	0.98 ± 0.17 ²⁾	395.25 ± 19.14 ²⁾
	SM	13.65 ± 0.67 ²⁾	545.77 ± 47.55 ²⁾	1.36 ± 0.17 ²⁾	359.62 ± 35.74 ²⁾
再灌末	sham	14.14 ± 0.63	622.78 ± 31.73	0.51 ± 0.12	412.76 ± 26.73
	IR	9.84 ± 0.66 ¹⁾	348.67 ± 32.75 ¹⁾	2.45 ± 0.16 ¹⁾	212.50 ± 23.36 ¹⁾
	EGCG ₁	13.23 ± 0.74 ²⁾	504.43 ± 38.24 ²⁾	1.39 ± 0.15 ²⁾	327.64 ± 23.54 ²⁾
	EGCG ₂	13.48 ± 0.86 ²⁾	528.26 ± 34.63 ²⁾	1.24 ± 0.14 ²⁾	344.17 ± 18.59 ²⁾
	SM	13.09 ± 0.56 ²⁾	460.77 ± 33.79 ²⁾	1.51 ± 0.13 ²⁾	302.01 ± 35.78 ²⁾

注:同 sham 组比,¹⁾P < 0.01;同 IR 组比,²⁾P < 0.001

Note:compared with sham group,¹⁾P < 0.01;compared with IR group,²⁾P < 0.01

参组(SM):舌下静脉注射 SM 1g/kg(0.1mL/100g),余同②组。

1.6 观测指标及测定方法

全程记录大鼠左心室收缩压峰值(LVSP)、左心室等容收缩期最大压力变率(+ dp/dt_{max})、左心室舒张末压(LV-EDP)、左心室舒张期压力下降最大变率(- dp/dt_{max}),采集并打印缺血前、缺血末、再灌注末上述各参数值。

记录完毕,从腹主动脉取血制备血浆,按试剂盒说明测定血浆 SOD,MDA,LDH,CK 水平。同时取 LAD 供血区的心肌组织,用 4% 多聚甲醛溶液固定 24h,常规石蜡包埋,于缺血区中部沿左室轴线每隔 1mm 连续切取 5μm 厚的切片数张。按 TUNEL 法^[6]检测心肌凋亡细胞并计算凋亡指数(apoptotic index,AI)。采用链酶亲和素-生物素-酶复合物(streptavidin-biotin complex,SABC)免疫组化法检测凋亡相关基因 bcl-2 及 bax 的蛋白表达并计算蛋白阳性表达指数(positive expression index,PEI)及 bcl-2/bax 的比值。

1.7 数据处理

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行方差分析和组间 t 检验,以 P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 EGCG 对 MIR 大鼠左心功能的影响

缺血前反映心脏收缩功能(LVSP, + dp/dt_{max})和舒张功能(LVEDP, - dp/dt_{max})的参数在 EGCG 组有一定变化,但无显著性差异,而在其他各组较稳定。随着缺血和再灌注的进行,LVSP, + dp/dt_{max}, - dp/dt_{max}呈持续性下降,LVEDP 则持续性升高,其中以 IR 组更为明显(与 sham 组比,P < 0.01),而 EGCG 及 SM 组变化相对较缓(与 IR 组比,P < 0.01),提示心肌遭受一定时间的缺血和再灌注可引起心功能降低,EGCG 对此有改善作用,结果见表 1。

2.2 EGCG 对 MIR 大鼠血浆 SOD 和 MDA 水平的影响

表 2 EGCG 对 MIR 大鼠血浆 SOD 活性及 MDA 含量的影响 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of EGCG on the activity of SOD and the content of MDA in plasma of MIR rats(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Group	Dose (mg/kg)	SOD [nmol/mg(pro)]	MDA [nmol/mg(pro)]
Sham	—	354.56 ± 39.27	2.84 ± 0.21
IR	—	225.64 ± 27.16 ¹⁾	5.97 ± 0.34 ¹⁾
EGCG ₁	10	289.73 ± 32.27 ²⁾	4.15 ± 0.37 ²⁾
EGCG ₂	20	337.62 ± 26.13 ^{2,3)}	3.02 ± 0.27 ^{2,3)}
SM	100	306.22 ± 26.76 ²⁾	3.46 ± 0.26 ²⁾

注: 与 sham 组比,¹⁾P < 0.01; 与 IR 组比,²⁾P < 0.01; 与 SM 组比,³⁾P < 0.05

Note: ¹⁾P < 0.01 compared with sham group; ²⁾P < 0.01 compaerd with IR group; ³⁾P < 0.05 compared with SM group

2.3 EGCG 对大鼠血浆 LDH 及 CK 水平的影响

IR 组血浆 LDH 和 CK 水平明显高于 sham 组 (P < 0.01), 在 EGCG 与 SM 组则显著低于 IR 组 (P < 0.05 或 P < 0.01), 虽然大剂量 EGCG 的作用优于 SM, 但无显著性差异, 结果见表 3。

2.4 EGCG 对缺血再灌注心肌细胞凋亡和 bcl-2 与 bax 蛋白表达的影响

光镜下正常心肌细胞核呈蓝色, 凋亡阳性细胞核呈棕黄

表 4 EGCG 对 MIR 大鼠细胞凋亡及 bcl-2 与 bax 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Tab 4 Effects of EGCG on apoptosis and protein expression of bcl-2 and bax of myocardial ischemia reperfusion in rats($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Group	AI	bcl-2 PEI(%)	bax PEI(%)	bcl-2/bax
Sham	0	0.24 ± 0.02	0.21 ± 0.02	1.03 ± 0.24
IR	18.54 ± 3.71 ¹⁾	6.28 ± 1.73 ¹⁾	17.64 ± 4.48 ¹⁾	0.36 ± 0.04 ¹⁾
EGCG ₁	13.22 ± 2.84 ²⁾	9.62 ± 2.07 ²⁾	7.75 ± 1.83 ²⁾	1.26 ± 0.34 ²⁾
EGCG ₂	6.84 ± 2.19 ^{2,4)}	15.77 ± 3.51 ^{2,4)}	4.46 ± 1.12 ^{2,3)}	3.51 ± 0.37 ^{2,4)}
SM	12.46 ± 2.94 ²⁾	10.82 ± 3.34 ²⁾	6.18 ± 1.53 ²⁾	1.69 ± 0.22 ²⁾

注: 与 sham 组比¹⁾P < 0.01; 与 IR 组比²⁾P < 0.01; 与 SM 组比³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01

Note: ¹⁾P < 0.01 compared with sham group; ²⁾P < 0.01 compared with IR group; ³⁾P < 0.05, ⁴⁾P < 0.01 compared with SM group

3 讨论

心肌缺血的治疗首要环节是恢复缺血心肌的血流灌注, 但心肌遭受一定时间的缺血再灌注时, 由于自由基的聚集以及自由基介导的脂质过氧化反应和细胞内钙超载, 可进一步加重心肌的损伤。MDA 的含量可间接反映氧自由基的产生与组织的损伤程度, 而 SOD 的活性则可间接反映机体清除自由基和抗脂质过氧化的能力; LDH 和 CK 是心肌胞浆中的特异性酶, 其外漏的程度亦可间接反映心肌的受损程度。本实验结果显示: 大鼠心肌缺血 30min 再灌注 60min, 血浆 MDA、LDH 及 CK 含量明显升高, 而 SOD 水平明显降低, 同时心功能降低; 应用 EGCG 组大鼠则明显改善, 表明 EGCG 通过增强机体清除自由基的能力和抑制脂质过氧化反应, 对大鼠缺血再灌注所引起的心肌损伤和心功能降低具有明显的保护作用和改善作用。

表 3 EGCG 对 MIR 大鼠血浆 LDH 及 CK 水平的影响(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of EGCG on the levels of LDH and CK in plasma of MIR rats(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

Group	Dose(mg/kg)	LDH(U/L)	CK(U/L)
Sham	—	985.79 ± 99.05	54.95 ± 8.23
IR	—	1772.15 ± 118.53 ¹⁾	87.82 ± 10.3 ¹⁾
EGCG ₁	10	1513.27 ± 110.95 ²⁾	73.90 ± 7.36 ²⁾
EGCG ₂	20	1096.56 ± 121.37 ³⁾	63.27 ± 8.12 ³⁾
SM	100	1208.73 ± 101.24 ³⁾	68.53 ± 8.36 ³⁾

注: 与 sham 组比,¹⁾P < 0.01; 与 I/R 组比,²⁾P < 0.05, ³⁾P < 0.01

Note: ¹⁾P < 0.01 compared with sham group; ²⁾P < 0.05, ³⁾P < 0.01 compared with IR group

色, 主要位于缺血区与非缺血区交界处, 在缺血区内与非缺血区极少; 在 sham 组未见凋亡细胞, IR 组凋亡细胞明显多于 sham 组, AI 值显著高于 sham 组; EGCG 及 SM 组凋亡细胞数量明显少于 IR 组, AI 值显著低于 IR 组, 其中 EGCG₂ 组更明显。Bcl-2 与 bax 的蛋白着棕黄色, 表达部位与凋亡细胞相似, sham 组的 PEI 值均较低, bcl-2/bax 约等于 1; IR 组 bcl-2、bax 的 PEI 值显著高于 sham 组, 其中 bax 尤为显著, 而 bcl-2/bax 明显低于 IR 组; EGCG 及 SM 组的 bcl-2 PEI 值明显大于 IR 组, 而 bax 的 PEI 值则显著小于 IR 组, bcl-2/bax 显著大于 IR 组, 结果见表 4。

在心肌缺血再灌注损伤中, 细胞凋亡有其正面意义, 可以减少心肌细胞的坏死而达到保护心肌的作用, 但凋亡过度将会加重心肌的破坏和功能障碍。有研究表明^[7,8], 心肌缺血再灌注损伤时产生的自由基、钙超载、细胞因子(如 IL-6、TNF-α)等是促进细胞凋亡的诱导因素, 通过一定的信号转导方式激活生存与死亡的相关基因(如 bcl-2, bax, p53, fas, c-fos 等), 然后将信号转导到核内切酶, 执行死亡功能。其中 bcl-2 家族蛋白在调节细胞凋亡过程中起重要作用, bcl-2 和 bax 是两个重要的相关基因, 前者抑制细胞凋亡, 而后者促进细胞凋亡^[9]。Bcl-2 和 bax 调节细胞凋亡不仅取决于自身表达的高低, 而且 bcl-2/bax 蛋白表达的比例是决定细胞凋亡与否的关键, 当比例增大时, 细胞凋亡受抑制, 反之则使凋亡细胞增多^[10,11]。Bax 促进细胞凋亡的可能机制除 bax 本身具有促进细胞凋亡作用外, 还可通过①bax 与 bcl-2 形成异源

二聚体,抑制 bcl-2 的作用,并可抑制 bcl-2 家族中 bcl-xL 等基因的抑制凋亡作用;②bax/bax 形成同源二聚体,抑制线粒体细胞色素 C 的释放,促进细胞凋亡^[12]。本实验结果显示,缺血再灌注使 bcl-2 和 bax 的表达明显增多,但以 bax 的增多更为显著,使 bcl-2/bax 值显著降低,细胞凋亡明显。而给予 EGCG 治疗组 bcl-2 表达增加,bax 表达下降,bcl-2/bax 值升高,心肌细胞凋亡数量明显减少。由此推测,EGCG 抑制心肌细胞凋亡可能是其改善心功能的机制之一,而抑制心肌缺血再灌注引起细胞凋亡的机制可能与下调 bax 和上调 bcl-2 的蛋白表达,提高 bcl-2/bax 比值有一定关系,直接证据有待进一步验证。

参考文献

- [1] 王立中,鲍红光.缺血/再灌注损伤中的心肌细胞凋亡[J].国外医学·麻醉与复苏分册,2001,22(5):297
- [2] Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury [J]. J Pathol, 2000, 190(3):255
- [3] 谭晓华,周殿元,张亚历,等.蛋白激酶 C 在表没食子儿茶素没食子酸酯诱导 LoVo 细胞凋亡中的作用[J].中国药理学通报,2000,16(4):418
- [4] 粟数,陈远贞,王志华.大白鼠实验性心肌缺血再灌注模型制备与心电图改变的特点.重庆医科大学学报[J],1998,23(1):8
- [5] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1994,854
- [6] Gold R, Schmied M, Giegerich G, et al. Differentiation between

cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques. Lab Invest [J]. 1994, 71(2):219

- [7] Vishna K, Steve E. Alterations in immunocyte tumor necrosis factor receptor and apoptosis in patients with congestive heart failure [J]. Annals of Surgery, 2002, 236(2):254
- [8] Scaramelli TM, Stephanou A, Pasini E, et al. Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury [J]. Circ Res, 2002, 90(6):745
- [9] Melo G, Agrawal R, Zhang L, et al. Gene therapy strategy for long-term myocardial protection using adeno-associated virus-mediated delivery of heme oxygenase gene [J]. Circulation, 2002, 105(2):602
- [10] Xie Z, Koyama T, Suzuki J, et al. Coronary reperfusion following ischemia: different expression of bcl-2 and bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis [J]. Jpn Heart J, 2001, 42(6):759
- [11] McClintock DS, Santore MT, Lee VY, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(1):94
- [12] Borutaite V, Budrionaitė A, Morkuniene R, et al. Release of mitochondrial cytochrome C and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischemia [J]. Biochimica Biophysica Acta, 2001, 1537(11):101

收稿日期:2004-06-22