

EGCG 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及作用机制探讨*

胡佳¹, 古君¹, 许飞², 张洪伟¹, 范康钧¹, 秦超毅¹, 肖正华¹, 张尔永^{1△}

1. 四川大学华西医院 心脏大血管外科(成都 610041); 2. 成都市妇女儿童中心医院 麻醉科(成都 610091)

【摘要】 目的 观察没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对大鼠心肌缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)的保护作用,并探讨其作用机制。方法 建立大鼠急性心肌缺血再灌注(I/R)模型,将大鼠分为假手术组(SO组)、I/R组和EGCG组。EGCG组(10 mg/kg)在再灌注开始前5 min予以静脉滴注。采用心电图记录仪观察I/R过程中室性心律失常发生频次并评分,检测大鼠血清中心肌酶学〔乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)〕水平,心肌组织中炎症因子〔肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6和白介素-8(IL-6和IL-8)〕的表达,心肌组织HE染色进行病理学观察,Western blot检测磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(Akt)通路蛋白中磷酸化的PI3K调节亚基(p-p85)和Akt蛋白(p-Akt)表达水平。结果 I/R组大鼠各类室性心律失常的频次增加明显,其心律失常严重程度评分($P < 0.01$)、血清中LDH与CK表达水平、心肌组织中TNF- α 、IL-6和IL-8的表达水平均高于SO组($P < 0.05$);EGCG组心律失常严重程度评分、LDH与CK的表达水平、心肌组织中TNF- α 、IL-6和IL-8的表达水平均低于I/R组($P < 0.05$),并且EGCG组大鼠心肌病理学损伤程度轻于I/R组,EGCG组大鼠心肌中p-p85与p-Akt表达水平高于I/R组($P < 0.05$)。结论 EGCG能通过激活PI3K/Akt信号通路抑制炎症反应水平,有效减轻IRI。

【关键词】 没食子儿茶素没食子酸酯 心肌缺血再灌注损伤 心肌梗塞 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B 炎症

Epigallocatechin-3-gallate Attenuates Myocardial Reperfusion Injury in Rats Through Activation of PI3K/Akt Signaling Pathway HU Jia¹, GU Jun¹, XU Fei², ZHANG Hong-wei¹, FAN Kang-jun¹, QIN Chao-yi¹, XIAO Zheng-hua¹, ZHANG Er-yong^{1△}. 1. Department of Cardiovascular Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Anesthesiology, Chengdu Women and Children's Central Hospital, Chengdu 610091, China

△ Corresponding author, E-mail: eyzang@outlook.com

【Abstract】 **Objective** This study was designed to investigate whether epigallocatechin-3-gallate (EGCG) postconditioning protects the heart against ischemic-reperfusion injury (IRI), and to explore its potential mechanisms in a rat model. **Methods** Male Wistar rats were subjected to myocardial ischemia (30 min) and reperfusion (up to 2 h) and the rats were divided into sham group (SO) group, ischemia-reperfusion (I/R) model group and EGCG group. EGCG group were treated with EGCG (10 mg/kg) via intravenous infusion 5 min before reperfusion. Electrocardiogram were applied to record ventricular arrhythmia frequency. The severity of myocardial injury [serum level of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK), hematoxylineosin (HE) staining] and ventricular arrhythmia, and the serum levels of inflammatory cytokines [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins-6 (IL-6) and IL-8] were assessed with ELISA, electrocardiogram and Western blot respectively. **Results** EGCG given before reperfusion could effectively reduce the serum level of LDH and CK and the incidence of ventricular arrhythmia ($P < 0.05$, respectively), improved the pathological damage. Meanwhile, EGCG could down-regulate the expression levels of TNF- α , IL-6, IL-8 in the myocardial tissue after IRI ($P < 0.05$, respectively). The expression levels of p-p85 and p-Akt in the EGCG group were significantly up-regulated compared to those in I/R group ($P < 0.05$, respectively). **Conclusion** EGCG-related anti-inflammatory action could attenuate rat myocardial IRI and this cardioprotective effect might be activated through the PI3K/Akt pathway.

【Key words】 Epigallocatechin Ischemia reperfusion injury Myocardial infarction PI3K/Akt Inflammation

随着人口老龄化和心血管病危险因素流行,迅速壮大的急性心肌梗塞患者群体已为我国医疗卫生资源带来沉重负担^[1]。研究显示,患者的心肌梗

* 国家自然科学基金(No. 81300155)资助

△ 通信作者, E-mail: eyzang@outlook.com

塞面积与其近远期不良事件发生率密切相关^[1-2],目前临床治疗均为采用积极介入或溶栓等方法尽早地恢复缺血组织血氧供应,以期抢救存活心肌,减少心肌梗死范围。然而,恢复心肌血供本身也会加重心肌细胞损伤,增加梗死面积,这种现象被称为缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)^[2-3]。虽然目前心肌 IRI 的机制尚未阐明,但多数学者均认为急性心肌梗塞发生后伴随的炎症反应是导致 IRI 的重要因素之一^[2-4]。

没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)是绿茶中主要抗氧化、抗炎活性成分^[5]。部分研究证实 EGCG 能通过抑制炎症因子表达来减轻肝、肾等内脏器官 IRI^[6-8],可减少动物心肌 IRI 的心梗面积^[7]。但有关 EGCG 减轻心肌 IRI 的确切机制探索报道较少。为此,本研究通过观察 EGCG 对大鼠心肌 IRI 中炎症反应的影响,探讨 EGCG 的保护作用与在炎症进程中发挥重要调控作用的磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidyl inositol 3-kinase, PI3K) / 蛋白激酶 B (Akt) 信号通路的潜在关系。

1 材料及方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

成年雄性 Wistar 大鼠 30 只,体质量 220~250 g,购自四川大学实验动物中心。EGCG(纯度 95%,美国 Sigma 公司);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);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-6 和白介素-8 (IL-6 和 IL-8) ELISA 检测试剂盒(美国 Biosource 公司);磷酸化 PI3K 调节亚基(p-p85)抗体(Abcam, USA, 1:1 000),磷酸化 Akt(p-Akt)抗体(CST, USA, 1:500),Akt 抗体(CST, USA, 1:1 000),二抗(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)。ECG26511 型心电图仪(上海光电医用电子仪器有限公司);DH2140 型动物人工呼吸机(浙江医科大学医学仪器实验厂);光学显微照相系统(OLYMPUS, 日本);IBAS 型全自动图像处理系统(IBAS, 德国)。

1.2 IRI 模型制作及动物分组

将大鼠用戊巴比妥钠(100 mg/kg,腹腔内注射)进行麻醉,利用小动物呼吸机进行机械通气。然后将大鼠仰卧固定在电热毯上,将体温维持在 37℃。分别置入颈总动脉和颈内静脉导管进行血流

动力学监测和给药。将钢针电极固定于胸部皮下进行心电图监测。通过左胸骨旁切口将胸廓切开,暴露左心室前壁。经过 20 min 的稳定期后,用 4-0 丝线将左冠状动脉前降支近端结扎 30 min,之后松开结扎线并维持 2 h 再灌注。将大鼠随机分为 3 组(每组 10 只):假手术(sham-operation, SO)组,大鼠经手术操作但不进行缺血再灌注;缺血再灌注模型(ischemia/reperfusion, I/R)组,大鼠经冠状动脉结扎 30 min 后进行 2 h 再灌注;EGCG 组,操作同 I/R 模型组,但在再灌注开始前 5 min 予以静脉滴注 EGCG 10 mg/kg。各组大鼠再灌注 2 h 后处死。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 室性心律失常的观察及评分 通过心电图仪记录再灌注期间室性早搏、室性心动过速和室颤动的发生频率和累积时间,并根据 MILLER 等^[9]提出的心律失常评分系统评估缺血再灌注相关心律失常的严重程度。

1.3.2 血清心肌酶学检测 再灌注结束后,采集大鼠腹主动脉血液标本,离心(1 000 r/min)10 min 获取血清,按试剂盒说明测定血清中心肌酶学(LDH 和 CK)水平。

1.3.3 心肌组织炎症因子的表达检测 获取左前降支供血区域心肌,部分按 ELISA 试剂盒说明测定心肌组织匀浆中炎症因子(TNF- α 、IL-6 和 IL-8)的表达。

1.3.4 心肌组织病理学观察及 PI3K/Akt 通路蛋白的表达 取左前降支供血区域部分心肌组织,保存于体积分数为 4%的甲醛溶液中,固定 24 h 后常规石蜡包埋,于缺血区中部沿左室轴线每隔 1 mm 连续切取 5 μ m 厚的切片数张进行苏木素-伊红(HE)染色;其余心肌组织保存于-80℃条件下冷冻保存,进行 Western blot,检测 PI3K/Akt 通路蛋白中 p-p85 和 p-Akt 表达水平^[10]。

1.4 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用方差分析和组间 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况及血流动力学参数

成功建立大鼠心肌急性 I/R 模型,大鼠均存活。各组大鼠体质量、心脏质量以及 I/R 期间的血流动力学参数差异无统计学意义,见表 1。

2.2 EGCG 对大鼠心肌 I/R 室性心律失常和血清心肌酶学的影响

表 1 各组大鼠基础情况及血流动力学参数

Table 1 Baseline and change of hemodynamics in each group

Variable	SO group (n=10)	I/R group (n=10)	EGCG group (n=10)
Body mass/g	236±13	233±12	227±16
Heart mass/g	1.13±0.04	1.15±0.03	1.16±0.05
p_a , syst/mmHg			
Baseline	109±7	106±9	103±4
I-30	110±8	105±4	101±3
R-60	104±2	112±5	110±6
R-120	105±3	103±3	105±4
p_a /mmHg			
Baseline	99±6	95±6	94±4
I-30	98±7	92±5	88±5
R-60	96±5	94±4	94±4
R-120	97±3	94±6	92±6
p_a , diast/mmHg			
Baseline	88±5	83±2	85±3
I-30	85±4	79±3	74±3
R-60	87±4	76±4	77±4
R-120	88±3	85±6	79±3
HR/min ⁻¹			
Baseline	357±19	346±15	363±19
I-30	349±17	354±14	354±18
R-60	362±14	362±16	361±15
R-120	354±16	358±15	359±17

SO: Sham-operation; I/R: Ischemia/reperfusion; HR: Heart rate; I-30:30 min after the start of ischemia; R-60/120: 60/120 min after the start of reperfusion. 1 mmHg=0.133 kPa

由表 2 和图 1 可见,与 SO 组相比,I/R 组大鼠再灌注期间各类室性心律失常的频次增加明显,其心律失常严重程度评分($P<0.01$)和血清中 LDH 与 CK 表达水平均高于 SO 组($P<0.05$)。而与 IR 组相比,EGCG 能有效降低大鼠缺血心肌再灌注期间的心律失常严重程度评分($P<0.01$)和血清中 LDH 与 CK 的表达水平($P<0.05$),说明 EGCG 对 I/R 心肌有保护作用。

表 2 大鼠 I/R 期间心率失常严重程度

Table 2 Serious ventricular arrhythmia in the heart against ischemic-reperfusion injury period in rat

Variable	SO group (n=10)	I/R group (n=10)	EGCG group (n=10)
PVC episodes/times	26.4±17.5	223.8±50.4	111.2±32.2
VT episodes/times	0	27.2±7.5	14.8±3.6
VF episodes/times	0	5.6±2.7	1.8±0.8
Total duration/s	0	40.2±18.8	6.2±3.3
VAS	1.4±0.3	8.3±1.0*	5.1±0.8*·#

PVC: Pre-ventricular contraction; VT: Ventricular tachycardia; VF: Ventricular fibrillation; VAS: Ventricular arrhythmia scores. * $P<0.05$, vs. SO group; # $P<0.05$, vs. I/R group

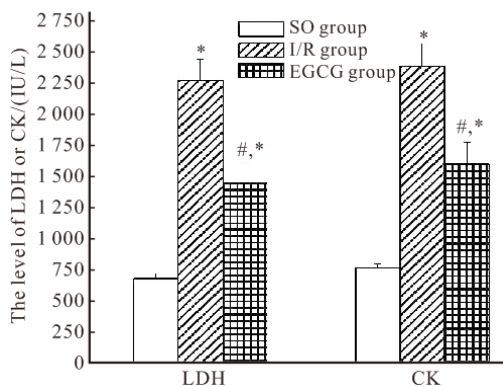


图 1 EGCG 对血清心肌酶学的影响

Fig 1 The effects of EGCG on myocardial kinases

LDH: Lactate dehydrogenase; CK: Creatine kinase; IU: International units. * $P<0.05$, vs. SO group; # $P<0.05$, vs. I/R group

2.3 EGCG 对大鼠 I/R 心肌炎症因子表达水平的影响

由图 2 可见,I/R 组大鼠心肌组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的表达水平升高,与 SO 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。虽然 EGCG 组各炎症因子表达水平均高于 SO 组($P<0.05$),但相较于 I/R 组降低($P<0.05$)。结果表明,EGCG 能有效抑制 I/R 激发的局部心肌组织炎症反应。

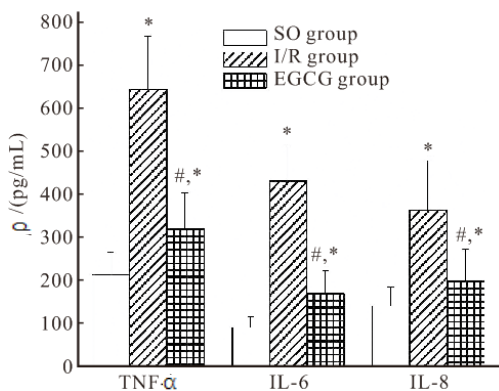


图 2 EGCG 对心肌组织中炎症因子表达的影响

Fig 2 The effects of EGCG on the inflammatory cytokines

The expression levels of TNF- α , IL-6 and IL-8 in myocardial tissue were quantified by using specific ELISA kits. * $P<0.05$, vs. SO group; # $P<0.05$, vs. I/R group

2.4 EGCG 对大鼠 I/R 心肌的病理学影响

见图 3。SO 组大鼠心肌细胞排列整齐、无变性,间质无水肿、出血;I/R 组大鼠心肌细胞排列紊乱、局部变性、间质水肿,心肌肌浆呈嗜伊红染色,横纹模糊不清或消失,肌纤维及肌丝明显紊乱;

EGCG 组大鼠心肌细胞水肿、变性较 I/R 组减轻,心肌纤维束紊乱,局部呈波纹状改变,部分肌纤维溶解液化。

2.5 EGCG 对大鼠 I/R 心肌 PI3K/Akt 通路蛋白的影响

相较于 SO 组, I/R 组大鼠心肌组织中 p-p85 和

p-Akt 表达活性略有升高,但两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$);而 EGCG 组 p-p85 和 p-Akt 蛋白表达活性高于 SO 组和 I/R 组,且差异有统计学意义 ($P<0.05$),见图 4。结果表明,EGCG 可通过调控 PI3K/Akt 通路的活性蛋白表达来减轻急性心肌缺血再灌注引致的炎症反应。

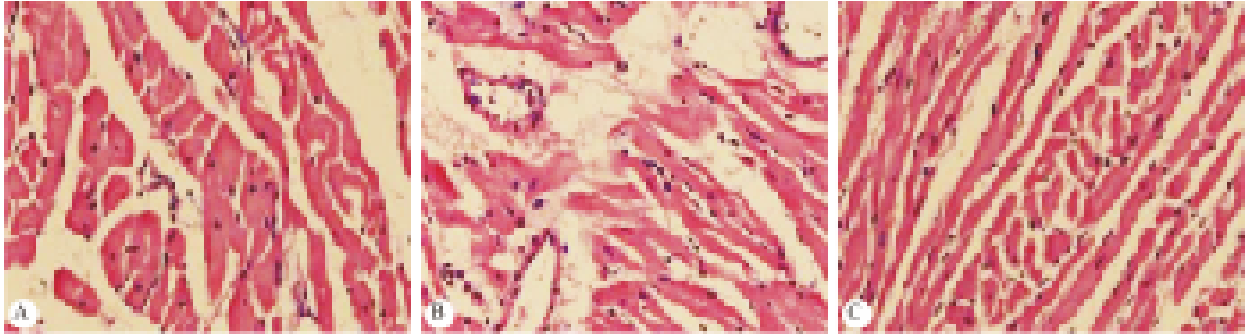


图 3 心肌组织病理学观察。HE $\times 200$

Fig 3 Histological analysis of the myocardial tissue. HE $\times 200$

A: SO group; B: I/R group; C: EGCG group

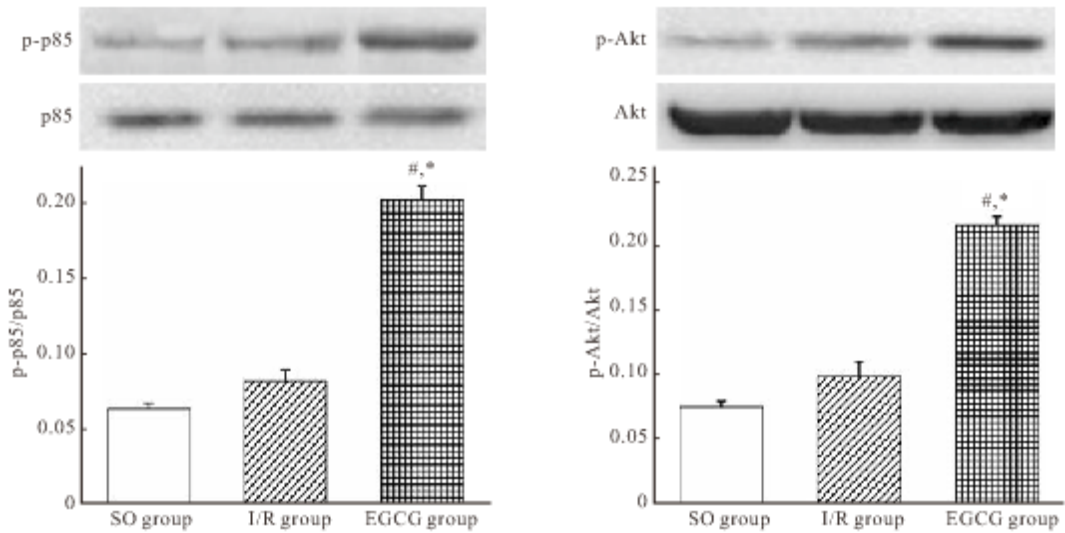


图 4 Western blot 检测 EGCG 对心肌中 PI3K/Akt 通路蛋白表达的影响

Fig 4 Effects of EGCG on PI3K/Akt signaling pathway

* $P<0.05$, vs. SO group; # $P<0.05$, vs. I/R group

3 讨论

本研究发现 EGCG 可有效降低大鼠急性心肌 I/R 引致的多种炎症因子和心肌酶学的表达水平,缩短 I/R 诱发的室性心律失常持续时间并减少其发生频次。更为重要的是,我们发现 EGCG 可能是通过上调 PI3K/Akt 通路的活性蛋白表达水平来发挥其保护缺血心肌再灌注损伤的作用。

既往研究显示接受再灌注的缺血组织会诱发明显的炎症细胞黏附,随后释放的多种促炎因子会进

一步加剧炎症级联反应,加重缺血区域心肌细胞损害^[2-3,10-11]。我们通过大鼠急性心肌 I/R 模型发现,再灌注结束后大鼠心肌中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的表达水平与其组织病理变化、心肌酶学改变以及心律失常严重程度评分有关。因此,本研究结果表明炎症反应积极参与促进了心肌 IRI 的功能活动,并提示在心肌 I/R 过程中进行抗炎治疗的策略或能起到有效的心肌保护作用。

心肌缺血缺氧时,会通过黄嘌呤氧化酶系统、中性粒细胞和线粒体等多途径产生大量氧自由基,而

后者历来被认为是造成心肌细胞 IRI 的关键因素之一^[7-8,12-13]。部分研究发现,EGCG 可升高细胞内抗氧化酶活性和非酶性抗氧化物水平,增强还原性辅酶 II 和细胞色素 P450 还原酶活性,提高缺血心肌细胞的抗氧化损伤能力^[6-7,12-13]。然而,近期也有证据显示 EGCG 在氧化应激状态下可在完整细胞内发挥促氧化的功能效应^[14-15]。因此,仅以 EGCG 的抗氧化活性解释其对心肌 IRI 的保护作用较为片面。在本实验中,我们发现经过 EGCG 预处理的大鼠心肌组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 的表达水平低于未处理组。考虑到 EGCG 组中各项反映心肌损伤和功能的指标均优于 I/R 组,我们认为 EGCG 具有的抗炎活性在大鼠心肌 IRI 进程中也起到了重要的心肌保护作用。

早期研究认为 PI3K/Akt 信号通路主要涉及细胞周期调控、凋亡的启动、血管生成、端粒酶活性和细胞侵袭性等诸多方面,而针对 PI3K/Akt 通路的治疗策略可通过激活一系列促增殖、抑凋亡的功能蛋白,如血管内皮生长因子(VEGF)、核转录因子(NF- κ B)等来达到有效的脏器保护作用^[7,11]。近期有学者发现 PI3K/Akt 信号通路的激活在炎症反应进程中发挥了重要的负向反馈调节的作用^[10-11]。同样,在本研究中,我们发现 p-p85 和 p-Akt 蛋白的表达活性在 EGCG 组中升高,而各类炎症因子的表达水平下调。这些数据说明,PI3K/Akt 信号通路的激活能缓解缺血再灌注引起的炎症反应,减少促炎因子的产生,从而起到有效的心肌保护作用。

总之,本研究结果表明,EGCG 预处理可通过激活 PI3K/Akt 信号通路降低大鼠缺血心肌再灌注过程中的炎症反应水平,减轻急性心肌 IRI。因而,EGCG 和其相关机制研究可为针对心肌 IRI 的治疗提供新思路和方法。

参 考 文 献

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等. 中国心血管病报告 2013 概要. 中国循环杂志,2014,29(7):613-615.
- [2] MINAMINO T. Cardioprotection from ischemia/reperfusion injury: basic and translational research. *Circ J*,2012,76(5):1074-1082.
- [3] HAUSENLOY DJ, YELLON DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *J Clin Invest*,2013,123(1):92-100.
- [4] 秦素兰,刘陕岭,王儒蓉. 辣椒素对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究. 四川大学学报(医学版),2008,39(4):550-554.
- [5] 李志强,葛彦双,曾春菡,等. 油茶叶茶多酚的提取及其抗氧化活性研究. 四川大学学报(自然科学版),2014,51(5):1056-1062.
- [6] KAKUTA Y, OKUMI M, ISAKA Y, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate protects kidneys from ischemia reperfusion injury by HO-1 upregulation and inhibition of macrophage infiltration. *Transpl Int*,2011,24(5):514-522.
- [7] ANEJA R, HAKE PW, BURROUGHS TJ, *et al.* Epigallocatechin, a green tea polyphenol, attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Mol Med*,2004,10(1/2/3/4/5/6):55-62.
- [8] GIAKOUSTIDIS DE, GIAKOUSTIDIS AE, ILIADIS S, *et al.* Attenuation of liver ischemia/reperfusion induced apoptosis by epigallocatechin-3-gallate via down-regulation of NF-kappaB and c-Jun expression. *J Surg Res*,2010,159(2):720-728.
- [9] MILLER LE, HOSICK PA, WRIEDEN J, *et al.* Evaluation of arrhythmia scoring systems and exercise-induced cardioprotection. *Med Sci Sports Exerc*,2012,44(3):435-441.
- [10] HU G, HUANG X, ZHANG K, *et al.* Anti-inflammatory effect of B-type natriuretic peptide postconditioning during myocardial ischemia-reperfusion: involvement of PI3K/Akt signaling pathway. *Inflammation*,2014,37(5):1669-1674.
- [11] WILLIAMS DL, OZMENT-SKELTON T, LI C. Modulation of the phosphoinositide 3-kinase signaling pathway alters host response to sepsis, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Shock*,2006,25(5):432-439.
- [12] KIM JA, FORMOSO G, LI Y, *et al.* Epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol, mediates NO-dependent vasodilation using signaling pathways in vascular endothelium requiring reactive oxygen species and Fyn. *J Biol Chem*,2007,282(18):13736-13745.
- [13] ELBLING L, WEISS RM, TEUFELHOFER O, *et al.* Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major tea catechin, exert oxidant but lack antioxidant activities. *FASEB J*,2005,19(7):807-809.
- [14] POTENZA MA, MARASCIULO FL, TARQUINIO M, *et al.* EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2007,292(5):E1378- E1387.
- [15] AI W, ZHANG Y, TANG QZ, *et al.* Silibinin attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis through blocking EGFR-dependent signaling. *J Cell Biochem*,2010,110(5):1111-1122.

(2015-09-11 收稿,2015-11-02 修回)

编辑 沈 进