

表没食子儿茶素没食子酸酯对血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大的抑制作用*

王 晓¹, 陈 华² (1. 四川省达州市中心医院消化内科 635000; 2. 重庆三峡医药高等专科学校基础医学部, 重庆 404202)

【摘要】 目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对血管紧张素 II (Ang II)诱导的心肌细胞肥大的抑制作用及其可能的作用机制。**方法** 利用原代培养的新生大鼠心肌 Ang II (0.1 $\mu\text{mol/L}$)诱导制备心肌细胞肥大模型,检测 EGCG (0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$)干预后,心肌细胞培养上清液一氧化氮(NO)浓度和一氧化氮合酶(NOS)及 Ca^{2+} -ATP 酶活性,同时检测心肌细胞钙调神经磷酸酶(CaN) mRNA 的表达和钙调神经磷酸酶 α -亚基(CnA)蛋白的表达情况。**结果** 对照组的 Ang II 使心肌细胞发生明显肥大,细胞内 NOS 和 Ca^{2+} -ATP 酶活性下降,而 CaN mRNA 和 CnA 蛋白表达增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);EGCG 不同剂量组均明显减轻 Ang II 诱导的心肌细胞肥大程度,增加 NOS 和 Ca^{2+} -ATP 酶活性,促进 NO 释放,下调 CaN mRNA 和减少 CnA 蛋白表达,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** EGCG 抑制 Ang II 诱导的心肌细胞肥大作用机制可能与 EGCG 增加 NO 释放,升高 NOS 和 Ca^{2+} -ATP 酶活性,抑制 CaN 信号转导通路及降低 CnA 蛋白表达有关。

【关键词】 表没食子儿茶素没食子酸酯; 心肌细胞肥大; Ca^{2+} -ATP 酶; 一氧化氮合酶; 钙调神经磷酸酶

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.16.012 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)16-2328-03

Inhibitory effect of EGCG on cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin II * WANG Xiao¹, CHEN Hua²
(1. Department of Gastroenterology, Dazhou Municipal Central Hospital, Dazhou, Sichuan 635000, China; 2. Department of Basic Medicine, Three Gorges Medical College, Chongqing 404202, China)

【Abstract】 Objective To investigate the inhibitory effect of epigallocatechin gallate(EGCG) on cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin II (Ang II) and its potential mechanisms. **Methods** The primarily cultured cardiomyocyte Ang II (0.1 $\mu\text{mol/L}$) from sprague dawley neonatal rats was adopted to induce and prepare the cardiomyocyte hypertrophy model. The nitric oxide (NO) content, activity of nitric oxide synthetase (NOS) and Ca^{2+} -ATPase activity in the supernatant fluid of cardiomyocytes culture after EGCG (0.5, 1.0, 2.0 $\mu\text{mol/L}$) intervention were measured. Meanwhile the mRNA expressions of calcineurin (CaN) in cardiomyocytes were detected by real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein expression of calcineurin catalytic subunit (CnA) was detected by Western blot. **Results** Ang II in the blank control group induced significant cardiomyocytes hypertrophy, intracellular NOS and Ca^{2+} -ATPase activity decrease, while CnA protein content and CaN mRNA expression increase ($P < 0.05$), different doses of EGCG significantly alleviated Ang II-induced cardiomyocyte hypertrophic degree, increased the activity of NOS and Ca^{2+} -ATPase, promoted the NO release, but down-regulated CaN mRNA and decreased CnA protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of EGCG inhibiting Ang II induced cardiomyocyte hypertrophy could be related with EGCG increasing NO release, elevating NOS and Ca^{2+} -ATPase activity, inhibiting CaN signal transduction pathway and decreasing CnA protein expression.

【Key words】 EGCG; cardiomyocyte hypertrophy; Ca^{2+} -ATP; NOS; CaN

心脏肥大的形成是由于高血压、慢性心功能不全等多因素长期刺激发生的复杂病理过程,这期间心肌细胞和间质部分均发生明显变化,内皮缩血管肽和血管紧张素 II (Ang II) 等因子刺激导致心肌细胞蛋白合成和体积增加,最终导致心肌重构^[1]。Ang II 是体液调节系统肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)主要活性物质之一,其作用于心肌膜 AT1 激活多种信号级联反应,激活心肌发生增厚、重构^[2]。心肌肥大已被列为心血管发病率和病死率的独立危险因素,对其发病机制和防治的研究一直是该领域的研究热点,但临床防治药物都有一定不良反应而影响临床治疗目标。流行病学研究显示黄酮类可以减少心脏疾病的病死率。绿茶中茶多酚重要的组分主要含 4 个单体,即表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、表儿茶素没食子酸酯(EGC)、表没食子儿茶素(EGC)和表儿茶素

(EC),其中 EGCG 占苯多酚的 30%~35%。研究表明 EGCG 具有抗氧化、抗炎等作用,对神经细胞损伤、糖尿病大鼠肾脏及大鼠酒精性肝损伤都具有一定的保护作用^[3]。此外,EGCG 能够抑制大鼠心肌肥厚胶原生成和细胞增殖,其作用机制可能与其抗氧化作用有关^[4]。近年来研究证实 EGCG 具有抗氧化、多靶点保护心肌等功能,对心肌肥大具有潜在的防治作用^[5]。本实验用 Ang II 诱导原代乳鼠心肌细胞建立心肌细胞肥大模型,通过检测心肌细胞一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、 Ca^{2+} -ATP 酶、钙调神经磷酸酶(CaN)和钙调神经磷酸酶 α -亚基(CnA)的变化情况,探讨 EGCG 用于抗心肌细胞肥大的作用机制,为 EGCG 用于预防心血管系统疾病提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

* 基金项目:重庆市基础与前沿研究计划项目(cstc2014jcyjA10049);重庆市卫生和计划生育委员会医学科研项目(20121096)。

作者简介:王晓,男,主治医师,本科,主要从事消化内科方面的临床工作。

1.1.1 动物 清洁级 SD 大鼠种鼠 75 只, 出生 1~2 d 清洁级 SD 大鼠, 重庆医科大学动物实验中心, 许可证号: SYXK(渝) 20022007。

1.1.2 仪器与试剂 仪器采用 Real-Time PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司), 凝胶成像仪 Mini Trans-Blot 电泳仪(美国 BIO-RAD 公司), 电转仪(美国 BIO-RAD 公司), Leica 光学显微镜(德国 Leica Microsystems Ltd 公司)。试剂采用 EGCG、胎牛血清、胰酶、抗 β -actin 抗体、逆转录试剂盒(重庆市卓诺生物技术有限公司), AngII、CnA 小鼠抗大鼠单克隆抗体(Sigma 公司), DMEM 培养基 GIBCO 产品, NO 测定试剂盒(江苏碧云天生物技术研究), NOS 测定试剂盒、 Ca^{2+} -ATP 酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所), SYBR® GREEN PCR Master Mix(Applied Bio-system 公司), 内参 GAPDH、CaN、NOS 引物(上海吉凯基因化学技术有限公司), 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(北京中杉金桥生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 50 只大鼠随机分组为对照组, 模型组(Ang II + 0.1 $\mu\text{mol/L}$ EGCG), EGCG 低剂量(Ang II + 0.5 $\mu\text{mol/L}$ EGCG)组, EGCG 中剂量(Ang II + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG)组; EGCG 高剂量(Ang II + 2.0 $\mu\text{mol/L}$ EGCG)组。EGCG 粉剂用二甲基亚砷溶解后 DMEM 稀释, 配置成浓度为 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$ 标准液备用。换无血清培养液 24 h 后加入 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 或 0.1 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 加上述不同剂量 EGCG, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 8 h 后检测。HE 染色观察发现 Ang II 组心肌细胞体积明显增大, 细胞肿胀, 分界不清; Ang II 合用 EGCG 组细胞明显缩小, 肿胀程度减轻。

1.2.2 乳鼠心肌细胞制备 取新生 1~2 d SD 乳鼠心室肌切碎加入 0.25% 胰蛋白酶消化, D-Hank's 液混悬后用不锈钢筛

过滤, 加入胎牛血清终止消化、离心, 弃上清液, 用培养基重悬后收集心肌细胞接种于 25 mL 培养瓶, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱培养(1 h 后加入 0.1 mmol $5'$ -溴-2-脱氧尿嘧啶核苷), 免疫组化鉴定细胞。

1.2.3 细胞上清液 NO 浓度、NOS 活性的测定 取上清液作心肌细胞 NO、NOS 活性测定。其中一部分 1 000 r/min 离心 5 min 后收集上清液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 供 NO 测定; 其余 3 000 r/min 离心 10 min 同法收集上清液, 检测 NOS 活性。NO 和 NOS 均采用比色法测定, 严格按试剂盒说明书要求操作。取 540 nm 波长测定 NO_2^- 与 Griess 试剂反应生成樱红色的吸光度值, 根据标准曲线计算出每孔 NO 水平。在 530 nm 波长下测定的吸光度, 代表 NOS 活性, 根据吸光度的大小计算出 NOS 活力。

1.2.4 Ca^{2+} -ATP 酶活性测定 将培养好的心肌细胞, 用无菌 PBS(pH7.35~7.45)漂洗 3 次, 给药 8 h 后, 胰酶消化细胞, 胎牛血清培养基中和胰酶, 生理盐水稀释后离心 20 min(3 000 r/min), 弃尽上清液后破碎细胞酶促反应测定磷, 根据标准曲线计算酶活性。严格按照试剂盒说明书所述方法进行操作。

1.2.5 实时反转录聚合酶链反应(RT-PCR)实验检测 CaN 基因表达 采用实时 RT-PCR 检测细胞内 CaN 基因的表达。从 GeneBank 中查出大鼠 CaN 基因的 mRNA 序列, 利用美国 PE 公司引物设计软件 Primer Express 设计转移性引物, 由上海吉凯基因公司合成。引物序列见表 1。取 1×10^6 心肌细胞, 根据 Trizol 试剂盒说明书操作提取总 RNA, 用紫外分光光度仪检测 RNA 纯度。采用反转录酶制备 cDNA(PrimeScript™ Buffer 4.0 μL , PrimeScript™ RT Enzyme Mix1.0 μL , OligodT Primer 1.0 μL , Random 6 mers 1.0 μL , Total RNA 1 μL)。按 SYBR® GREEN PCR Master Mix 条件进行扩增。见表 1。

表 1 实时 PCR 的引物序列

基因	GenBank 号	引物序列(5'~3')	产物长度(bp)
β -actin	NM 031144	F-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA; R-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	150
CaN	NM 017041	F-CTGAGATGCTGGTAAACGTCCTGA; R-TGCTCGGATCTTGTTCTGATG	122

1.2.6 Western-blot 检测心肌细胞中 CnA 蛋白质的表达水平 细胞经药物处理, 胰酶消化, 预冷的 PBS 洗 3 次, 加入裂解缓冲液 100 μL , 超声破碎细胞膜, 15 000 r/min 离心 20 min, 提取上清液蛋白质, 考马斯亮蓝法测定样品蛋白水平。灌制 10% 聚酰胺凝胶, 常规电泳, 转膜, 封闭。一抗 CnA 小鼠抗大鼠单克隆抗体(1:1 500)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 加入辣根酶标记二抗(1:3 000)室温孵育 2 h, ECL 显色。GAPDH 作为内参对照, 进行细胞间蛋白表达比较。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据处理及统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验; 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 心肌细胞 NO 浓度和 NOS 活性的变化 与对照组比较, 模型组 NO 的浓度和 NOS 的活性明显降低($P<0.05$)。与模型组比较, EGCG 加药组(0.5、1.0、2.0 $\mu\text{mol/L}$)上述指标均增加, EGCG 各剂量组组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.2 Ang II 诱导的肥大心肌细胞内 Ca^{2+} -ATP 酶和 CaN mRNA 表达的变化 与对照组比较, 模型组 Ca^{2+} -ATP 酶活性明显降低, 不同剂量 EGCG 均能使 Ca^{2+} -ATP 酶活性较模型组明显升高($P<0.05$)。同样 EGCG 各剂量组组间差异无统计学意义($P>0.05$)。实时 RT-PCR 检测结果显示, 与对照组比

较, Ang II 明显上调 CaN mRNA 的表达, EGCG 各剂量组明显抑制 Ang II 所致 CaN mRNA 表达的增加。见表 3。

表 2 EGCG 对 Ang II 诱导肥大心肌细胞 NO 和 NOS 水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	NO($\mu\text{mol/L}$)	NOS (U/mL)
对照组	1.95 $\pm$ 0.72	1.06 $\pm$ 0.53
模型组	1.19 $\pm$ 0.53*	0.69 $\pm$ 0.32*
EGCG 低剂量组	2.03 $\pm$ 0.62 [#]	1.03 $\pm$ 0.56 [#]
EGCG 中剂量组	2.17 $\pm$ 0.68 [#]	1.17 $\pm$ 0.63 [#]
EGCG 高剂量组	2.19 $\pm$ 0.65 [#]	1.12 $\pm$ 0.68 [#]

注: 与对照组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$ 。

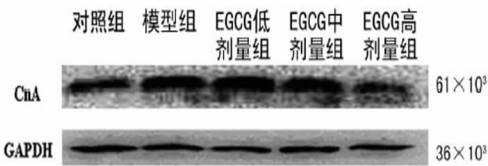


图 1 EGCG 对 Ang II 诱导的肥大心肌细胞中 CnA 蛋白表达的影响

2.3 Ang II 诱导的肥大心肌细胞中 CnA 蛋白表达的影响 结果表明, 与对照组比较, 模型组明显增加了心肌细胞 CnA 蛋白表达; 与模型组比较, EGCG 各剂量组均可以降低 Ang II 诱

导心肌细胞的 CnA 蛋白表达量。见图 1。

表 3 EGCG 对 AngⅡ 诱导的肥大心肌细胞中 Ca²⁺-ATP 酶和 CaN mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

分组	Ca ²⁺ -ATP 酶 (prot/h)	CaN mRNA (mmol/L)
对照组	0.98±0.12	100.00±9.36
模型组	0.23±0.03 [*]	399.26±39.41 [*]
EGCG 低剂量组	0.48±0.12 [#]	337.71±30.53 [#]
EGCG 中剂量组	0.73±0.13 [#]	287.65±29.82 [#]
EGCG 高剂量组	0.72±0.12 [#]	232.38±31.45 [#]

注:与对照组比较, ^{*} *P*<0.05;与模型组比较, [#] *P*<0.05。

3 讨 论

心肌肥厚是各种因素引起心肌工作超负荷的一种适应性反应,心肌细胞肥大是心肌肥厚病理生理学变化的重要基础,内皮素-1、儿茶酚胺和体液因子 AngⅡ 是致心肌肥厚的重要因素。AngⅡ 是经典的心肌细胞肥大的诱导剂,其诱导的心肌细胞肥大反应是心血管科研常用造模方法之一,AngⅡ 诱导并参与心肌细胞的整个病理过程。AngⅡ 诱导培养的心肌细胞肥大包括多条胞内信号途径及细胞直径和蛋白质合成增加等表型改变^[2-6]。

本实验应用 AngⅡ 诱导心肌细胞的方法建立了大鼠心肌细胞肥大模型,实验心肌细胞模型出现明显心肌细胞体积增加、细胞肿胀等病理学改变形态变化;与模型组比较,EGCG 不同剂量组均能抑制心肌细胞的肥大,细胞明显缩小,肿胀程度减轻。

实验模型组幼鼠心肌细胞 NOS 活性和 NO 浓度均降低,在培养的新生大鼠心肌细胞中血管紧张素通过其受体及 G 蛋白耦联受体,一方面引起心肌细胞肥大;另一方面抑制一氧化氮合酶活性和 NO 生成。在心肌肥厚的发生和发展过程中,除了致心肌肥厚的因素外,机体必然有一些防止心肌肥厚发生和发展的因子,内皮舒张因子 NO 是重要的候选因子之一,内源性 NO 可通过依赖机制减轻压力超负荷引起的心肌肥厚^[7]。EGCG 抑制 AngⅡ 诱导的细胞肥大同时明显升高 NOS 活性并增加心肌细胞上清液 NO 浓度,而心脏中 NO 浓度升高除可引起冠脉舒张、冠脉血流量增加和心肌收缩力下降外,在防止心肌肥厚反应中也起重要作用^[8-9]。

心肌肥厚常伴有肌浆网钙泵活性降低、钙离子紊乱,心肌肌浆网 Ca²⁺-ATP 酶通过摄取和释放 Ca²⁺ 在心脏的舒缩活动中发挥着重要作用^[10]。实验结果显示,与对照组比较,AngⅡ 诱导幼鼠心肌细胞 Ca²⁺-ATP 酶活性明显下降(*P*<0.05),Ca²⁺-ATP 酶活性的降低可引起钙循环紊乱,钙超载是形成心肌肥厚的主要机制之一,也是心肌舒缩功能障碍的重要病理生理机制。CaN 是目前发现的唯一受钙调素调节的丝苏氨酸蛋白磷酸酶,心肌细胞内 Ca²⁺ 水平增加可激活 Ca²⁺ 敏感的 CaN,近年研究发现 CaN 在心肌肥厚的发生中发挥重要作用,抑制活性可预防心肌肥厚的发生^[11]。检测结果显示 EGCG 不同剂量组 Ca²⁺-ATP 酶活性比对照组明显升高(*P*<0.05),CaN 表达量反之(*P*<0.05)。这一结果意味着 EGCG 对 Ca²⁺-ATP 酶活性和 CaN 表达量的调节作用可能也是 EGCG 抗心肌细胞肥厚的机制之一。

此外,钙调素结合可诱发 CnA 构象改变,暴露其磷酸酶活性位点,活化的 CnA 激活多种心肌肥大相关基因,同时诱导原癌基因表达,使心肌胚胎化,导致心肌细胞体积增大,蛋白核酸

合成增加,发生心肌重构^[12]。实验结果显示 EGCG 各剂量组均能不同程度降低 AngⅡ 诱导的心肌 CnA 表达,抑制 CaN 信号通路,表明其抗心肌细胞肥大作用可能与 EGCG 抑制 CaN 信号通路有关。

综上所述,EGCG 对 AngⅡ 诱导的心肌细胞肥大抑制的作用与 EGCG 促进 NO 的释放,调节 Ca²⁺-ATP 酶和 CaN mRNA 表达的增加,降低 CnA 蛋白表达有关。

参考文献

[1] Mosterd A, Hoes AW, Bruyne MC, et al. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; the rotterdam study[J]. Eur Heart J, 1999, 20(1):447-455.

[2] Nakagami H, Takemoto M, Liao JK, et al. NADPH oxidase-derived superoxide anion mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(7):851-859.

[3] 葛斌, 谢梅林, 顾正伦. 表没食子儿茶素没食子酸酯对大鼠高脂性脂肪肝的治疗作用及其机制研究[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(4):510-514.

[4] 盛瑞, 顾振纶, 谢梅林. EGCG 抑制心肌肥厚胶原生成和细胞增殖[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(9):1095-1099.

[5] 崔文明, 毛伟峰, 杜海方. 茶多酚和表没食子儿茶素没食子酸酯对血管紧张素Ⅱ诱导的心肌肥大的抑制作用[J]. 2008, 33(3):356-359.

[6] Clerk A, Cullingford TE, Fuller SJ, et al. Signaling pathways mediating cardiac myocyte gene expression in physiological and stress responses[J]. Cell Physiol, 2007, 212(2):311-322.

[7] Hunyady L, Turu G. The role of the AT1 angiotensin receptor in cardiac hypertrophy: angiotensin II receptor or stretch sensor [J]. Trends Endocrinol Metab, 2004, 15(9):405-408.

[8] Massion PB, Balligand JL. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice [J]. J Physiol, 2003, 546(1):63-75.

[9] Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase attenuates cardiac hypertrophy induced by chronic isoproterenol infusion [J]. Circ J, 2002, 66(9):851-856.

[10] 黄志明, 梁钢, 许盈. EGCG 对肾缺血再灌注时细胞凋亡的影响[J]. 广西医科大学学报, 2002, 19(4):496-498.

[11] Clint L, Cai Y, Masayoshi O, et al. Role of Ca²⁺/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy[J]. Circ Res, 2009, 105(10):956-964.

[12] Rinne A, Kapur N, Molkentin JD, et al. Isoform- and tissue-specific regulation of the Ca²⁺-sensitive transcription factor NFAT in cardiac myocytes and in heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(6):2001-2009.