

论著

绿茶及其有效成分对肾性高血压大鼠左心室肥厚的抑制作用

毛伟峰 宋雁 王伟 韩驰 李宁

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:目的 研究绿茶及其有效成分对肾性高血压大鼠左心室肥厚的抑制作用。方法 雄性 Wistar 大鼠 160 只,体重 180~220 g,随机分为 5 组,建立二肾一夹法大鼠肾性高血压左心室肥厚模型。假手术组(Sham),正常饮水;阳性对照组(二肾一夹法,2K1C),正常饮水;绿茶组(二肾一夹法加绿茶水,2K1C+GT),饮用 2% 绿茶水;茶多酚组(二肾一夹法加茶多酚水,2K1C+TP),饮用 0.1% 茶多酚水;表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)组(二肾一夹法加 EGCG 水,2K1C+EGCG),饮用 0.05% EGCG 水,术后即给予不同浓度的绿茶及其有效成分,持续 8 周。分别于实验第 0、4、8 周测量血压。8 周后处死测量左心室与体重比值(LVW/BW)和左心室壁厚度(LVWT),检测胚胎基因-心房利钠肽(embryonic gene atria natriuretic peptide,ANP),并对部分心肌组织 HE 染色进行病理组织学观察。结果 与假手术组比较,阳性对照组和各饮茶组血压、LVW/BW 和 LVWT 均显著升高($P < 0.01$)。而与阳性对照组相比,不同浓度的绿茶及其有效成分(2% 绿茶、0.1% 茶多酚、0.05% EGCG)LVW/BW 和 LVWT 显著降低,ANP 表达降低,肾性高血压左心室肥厚的组织病理学症状明显改善,但对大鼠收缩压无显著性影响。结论 在本实验条件下,绿茶及其有效成分对肾性高血压大鼠左心室肥厚有抑制作用。

关键词:茶;儿茶素;高血压;肾性;肥大;左心室;生物医学研究

Effects of Green Tea and Tea Extracts on Left Ventricle Hypertrophy Induced by Renovascular Hypertension in Rats

MAO Wei-feng, SONG Yan, WANG Wei, HAN Chi, LI Ning

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To investigate the preventive effects and the molecular mechanisms of green tea and tea extracts (polyphenols and EGCG) on left ventricle hypertrophy (LVH) induced by renovascular hypertension in rats. **Method** One hundred and sixty male Wistar rats were randomly divided into five groups: negative control group (Sham), positive control group (2K1C), green tea group (2K1C + GT), tea polyphenol group (2K1C + TP), EGCG group (2K1C + EGCG). After surgery operation, rats in different groups received tap water, tap water, 2% green tea, 0.1% tea polyphenol and 0.05% EGCG,

女微量营养素的摄入量普遍不足,特别是钙、锌、叶酸、维生素 B₂ 和维生素 A 的缺乏较为严重,均低于 2002 年全国营养与健康状况调查平均水平。

综上所述,山西省出生缺陷高发地区育龄妇女的微量营养素摄入不足,钙、锌、叶酸、维生素 B₂ 和维生素 A 的缺乏较为严重,亟待解决。建议当地居民平衡膳食,增加动物性食物的摄入,同时加强营养宣传教育,改善育龄妇女的膳食质量和营养状况。

参考文献

[1] 刘艳芳. 营养强化助人口出生缺陷干预 一臂之力[J]. 公众营

养专刊,2003,9(6):765-766.

[2] 翟凤英,杨晓光,葛可佑,等. 中国居民营养与健康状况调查报告之二——2002 膳食与营养摄入状况[M]. 北京:人民卫生出版社,2006.

[3] 中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量[M]. 北京:中国轻工业出版社,2002.

[4] 中国膳食指南专家委员会. 中国居民膳食指南文集[C]. 中国检察出版社,1999:54-58.

[5] 李勇. 营养与食品卫生学[M]. 北京:北京大学医学出版社,2005.

[6] 荫士安. 孕妇的微量营养素状况亟待关注[J]. 中国预防医学杂志,2001,35(6):363.

[收稿日期:2008-11-15]

中图分类号:R15;Q5;Q13 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2009)02-0106-04

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划(2006NAK02A07)

作者简介:毛伟峰 女 硕士

通讯作者:李宁 女 研究员

respectively, for 8 weeks. Then blood pressures were measured in the 0, 4th, 8th week, respectively, and the ratio of left ventricle weight to body weight (LVW/BW), the left ventricular wall thicknesses (LVWT) and embryonic gene atria natriuretic peptide (ANP) protein expressions were detected, and pathological changes of myocardial organizations were observed after HE staining. **Results** The results showed that the blood pressure, LVW/BW and LVWT in 2K1C group and tea-treatment groups significantly increased ($P < 0.01$) compared to those in Sham operation group. However, compared to these parameters in positive control group, the ratio of LVW/BW and LVWT in green tea group, tea polyphenols group and EGCG group significantly decreased ($P < 0.05$). ANP protein expressions in tea-treatment groups were also decreased. And obvious pathological changes induced by chronic 2K1C were markedly inhibited by long-term treatment of green tea and tea extracts. There was no significant impact on systolic blood pressure. **Conclusion** Green tea, tea polyphenols and EGCG could attenuate the development of left ventricular hypertrophy induced by renal hypertension in rats.

Key word: Tea; Catechin; Hypertension; Renal; Hypertrophy; Left Ventricular; Biomedical Research

心肌肥大(cardiac hypertrophy)是指在超负荷应激条件下心肌细胞体积的病理性增大,客观表现为心脏重量增加(包括左心室肥厚),它是猝死、冠心病和心力衰竭等多种心血管疾病的主要的独立性危险因素。血压升高是心肌肥大形成的重要因素^[1]。有研究报道茶对心血管系统疾病有预防作用。本文通过研究绿茶、茶多酚和表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin-3-gallate, EGCG)对两肾一夹肾性高血压大鼠心肌肥大形成过程的影响,探讨绿茶及其有效成分在抑制心肌肥大发生发展中的作用,为研究绿茶及其有效成分对心肌肥大的预防作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物 清洁级 Wistar 大鼠,雄性,180 ~ 220 g,购自北京实验动物研究中心,合格证号:SCXK <京> 200220003。

1.2 主要试剂和仪器 绿茶(green tea, GT)、茶多酚(tea polyphenols, TP) 中国农业科学院茶叶研究所提供,其中茶多酚纯度为 40%。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG) 罗氏公司提供,纯度 99.5%。山羊多克隆抗体 ANP、即用型兔 SP 免疫组化试剂盒 Santa Cruz 公司。DAB 显色试剂盒中杉金桥生物公司。苏木素染液、HE 染液 中杉金桥生物公司。RBP-1B 型大鼠血压计 中日友好医院临床医学研究所。光学显微镜 Nikon 公司。Image pro plus 4.0 图象分析系统 美国 SIM 公司。

1.3 动物模型与分组 160 只大鼠,大鼠适应性饲养 3 d 后,按体重随机分为阳性对照组(二肾一夹高血压左心室肥厚模型, two-kidney, one-clip renal hypertension model, 2K1C):正常饮水;绿茶组(2K1C + GT):饮用 2% 绿茶水;茶多酚组(2K1C + TP):饮用 0.1% 茶多酚水;EGCG 组(2K1C + EGCG):饮用 0.05% EGCG 水;假手术组(Sham):正常饮水。每组 32 只,试验期限为 8 周。实验期间大鼠单笼饲养,

喂饲基础饲料,自由饮水。

2K1C 经典制作方法^[2] 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,行腹正中切口切开,游离左肾动脉并用内径为 0.2 ~ 0.3 mm 银夹钳夹,使左肾动脉部分狭窄,右侧肾动脉不触及。假手术组方法同上,但不安置银夹。手术后即给予饮茶处理。凡术后 4 周内血压比术前增加 2.67 kPa (20 mmHg) 并高于 15.96 kPa (120 mmHg) 的大鼠,视为模型复制成功。

1.4 鼠尾收缩压测定 测定方法采用 tail-cuff 测压法^[3], 手术前、手术后 4 周及处死前各测压 3 次取其均值。

1.5 心肌组织标本的处理 大鼠喂茶 8 周后处死,处死前 12 h 禁食,麻醉后称重。开胸迅速摘下心脏,预冷的 PBS(0.02 mmol/L, pH = 7.4) 灌注,滤纸吸干,称重,并在 4 °C 下去除心房、右心室游离壁、大血管和心包组织,迅速分离左心室称重(包括室间隔),计算左心室重量指数 = 左心室湿重/体重(mg/g)。在左心室中部沿横轴切取 0.5 cm 厚的心肌组织置于 10% 甲醛中固定,石蜡切片,一部分用作免疫组织化学检查,一部分 HE 染色,并在光学显微镜下测左心室壁厚度(以室间隔和左心室前、后壁均值表示)并进行病理组织学观察。左心室剩余部分快速放入液氮中冷冻。

1.6 心肌组织 ANP 免疫组织化学测定[SP 法] 石蜡切片脱蜡至水;3% H₂O₂ 室温孵育 10 min,封闭内源性过氧化物酶,PBS 清洗;微波处理 10 min 修复抗原;10% 正常山羊血清室温孵育 10 min,消除背景染色;加入抗山羊多克隆抗体 ANP,工作浓度 1:500,4 过夜,PBS 洗;加生物素标记的羊抗鼠 IgG,37 °C 孵育 30 min,PBS 洗;加辣根酶标记的链酶卵白素工作液孵育 37 °C 30 min,PBS 洗;DAB 显色,苏木素复染,封片。采用 Image pro plus 4.0 图象分析系统,将载玻片置于光学显微镜(×200)下,随机挑选阳性细胞,更换视野,使每组细胞数大于 200,经微机处理后得出各组平均灰度及标准差。灰度越大表示抗原含量越高。

1.7 统计学分析

实验结果以平均值 ±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据采用 SPSS 10.0 软件进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 绿茶及其有效成分对 2K1C 组大鼠血压的影响

手术前各组血压差异无统计学意义。术后各个手术组血压逐渐升高,至 8 周末,与假手术组比差异都有统计学意义 ($P < 0.01$)。给予饮茶处理后,其血压与阳性对照组相比差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组动物血压变化 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

组别	0 周	4 周	8 周
Sham	112.71 ±4.73	114.96 ±6.63	114.51 ±6.42
2K1C	112.61 ±6.33	152.94 ±11.47	179.43 ±22.72 ^a
2K1C+GT	112.24 ±6.20	151.36 ±14.9 ^a	170.24 ±17.17 ^a
2K1C+TP	113.17 ±8.48	154.70 ±15.45	170.64 ±13.82 ^a
2K1C+EGCG	112.65 ±5.99	156.24 ±16.35	173.31 ±17.58 ^a

注:与 Sham 组相比, a 表示 $P < 0.01$;

Sham 为假手术组;2K1C 为阳性对照组;2K1C+GT 为绿茶组;2K1C+TP 为茶多酚组;2K1C+EGCG 为 EGCG 组。

2.2 绿茶及其有效成分对 2K1C 组大鼠心脏重量、左心室重量、脏体比和左心室壁厚度的影响

左心室重/体重 (LVW/BW) 和左心室壁厚度 (LVWT) 是衡量左心室肥厚程度的重要形态学指标。肾动脉缩窄产生的压力超负荷导致左心室心肌肥厚,术后 8 周各个肾性高血压组大鼠心脏重/体重 (HW/BW)、左心室重/体重和左心室壁厚度较假手术组均显著性增加 ($P < 0.01$);与 2K1C 组相比,各个饮茶组显著性降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 绿茶及其有效成分对大鼠左心室组织学形态的影响

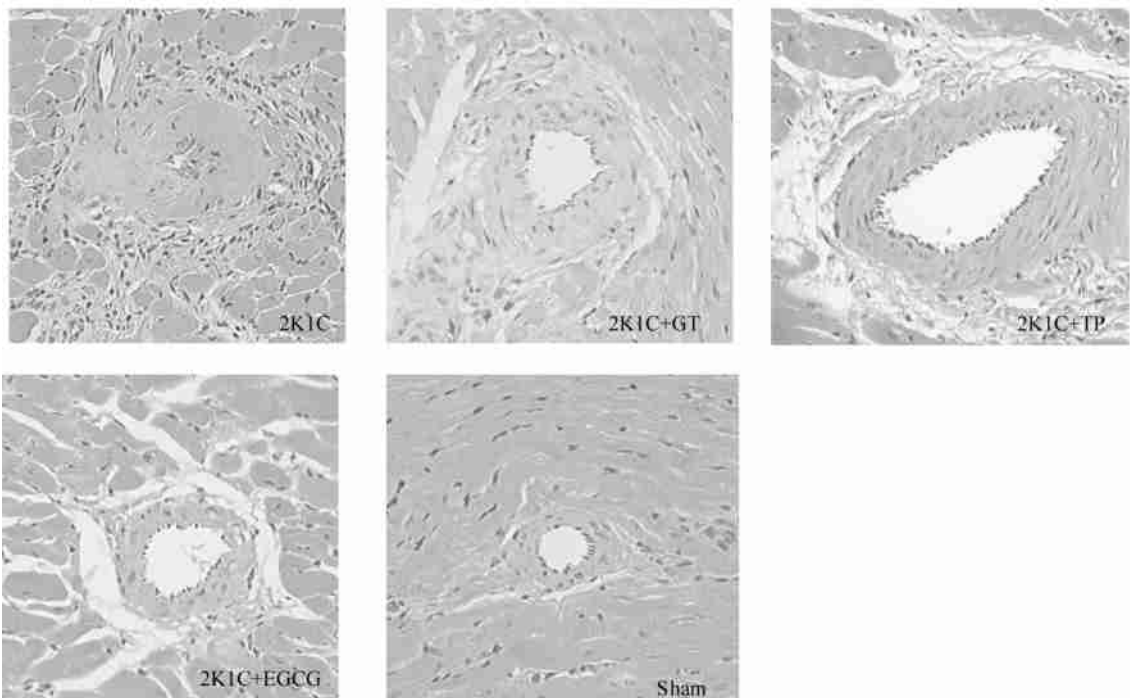
大鼠心肌组织切片 HE 染色后可以看到,较 Sham 组,2K1C 组见到明显的肾性高血压左心室肥厚的组织病理改变:冠小动脉增厚,平滑肌增生,部分动脉壁透明样变,血管周围结缔组织明显增生;心肌不同程度肥大,心肌细胞间成纤维细胞明显增多,灶性、片状心肌细胞溶解性坏死,病灶内结缔组织增生,部分形成瘢痕组织。各饮茶组亦见到相似的病理改变,但病变程度较 2K1C 组明显减轻,受累动物数量也较 2K1C 组减少。见图 1、图 2。

表 2 心脏重量、左心室重量以及脏体比和左心室壁厚度的测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	心脏		左心室		左心室壁厚度 (mm)
		重量(g)	比值(g/kg)	重量(g)	比值(g/kg)	
Sham	27	1.24 ±0.18	2.9 ±0.3	0.89 ±0.14	2.1 ±0.2	2.57 ±0.34
2K1C	27	1.60 ±0.18	4.4 ±0.8 ^b	1.24 ±0.15	3.4 ±0.6 ^b	3.24 ±0.32 ^b
2K1C+GT	25	1.51 ±0.25	3.8 ±0.6 ^{bc}	1.14 ±0.20	2.8 ±0.5 ^{bc}	2.91 ±0.29 ^{bc}
2K1C+TP	27	1.61 ±0.26	3.9 ±0.7 ^{ba}	1.13 ±0.21	2.9 ±0.6 ^{ba}	2.96 ±0.32 ^{bc}
2K1C+EGCG	28	1.53 ±0.25	4.0 ±0.9 ^{ba}	1.22 ±0.21	3.0 ±0.7 ^{ba}	3.05 ±0.28 ^{ba}

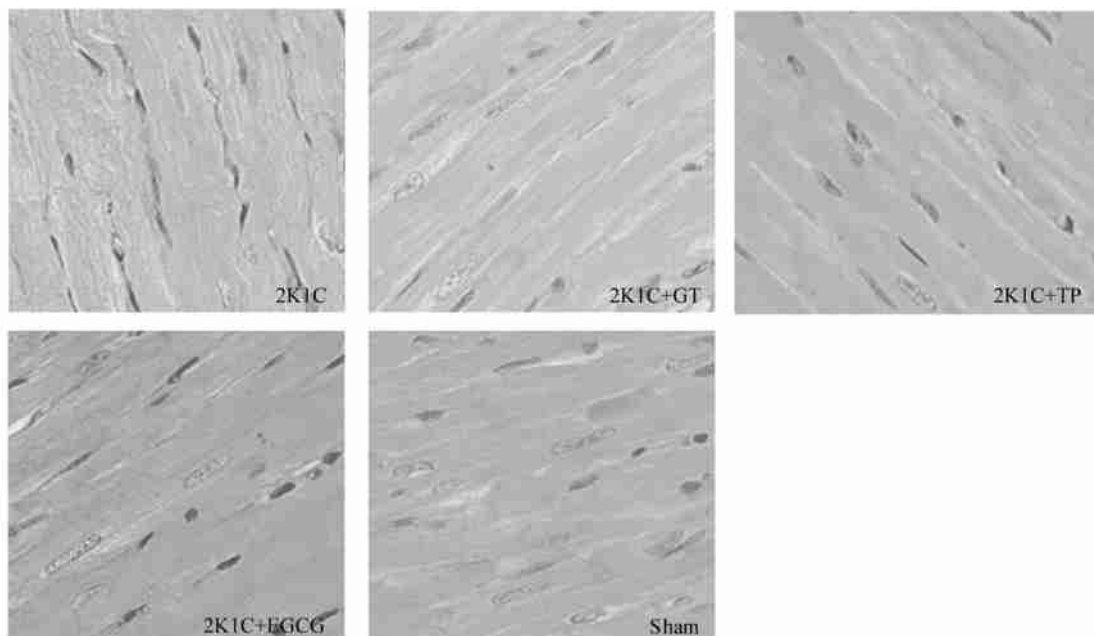
注:与 2K1C 组相比, a 表示 $P < 0.05$, c 表示 $P < 0.01$;与 Sham 组相比, b 表示 $P < 0.01$;

Sham 为假手术组;2K1C 为阳性对照组;2K1C+GT 为绿茶组;2K1C+TP 为茶多酚组;2K1C+EGCG 为 EGCG 组。



2K1C:阳性对照组;2K1C+GT:绿茶组;2K1C+TP:茶多酚组;2K1C+EGCG:EGCG组;Sham:假手术组

图 1 (×100)左心室小动脉的变化



Sham:假手术组;2K1C:阳性对照组;2K1C+GT:绿茶组;2K1C+TP:茶多酚组;2K1C+EGCG:EGCG组

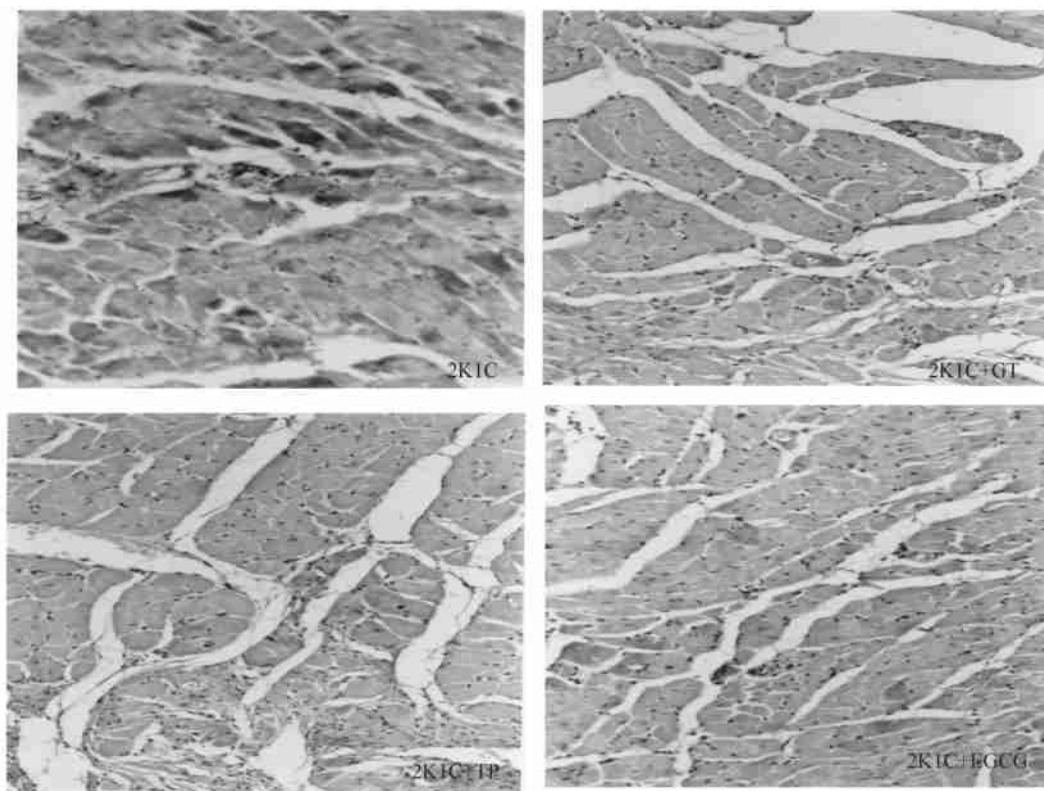
图2 (×200)左心室心肌细胞的变化

2.4 绿茶及其有效成分对左心室胚胎基因-心房利钠肽(embryonic gene atria natriuretic peptide, ANP)的影响

图3所示,胚胎基因-心房利钠肽 ANP 抗原分布在心肌细胞胞浆中,在图中表现为棕色的阳性颗粒。2K1C组心肌胞浆中阳性颗粒(棕色)多,表明

ANP 明显表达增高,用绿茶、茶多酚和 EGCG 干预的大鼠心肌胞浆中阳性颗粒减少,ANP 表达明显下降。

表5所示,通过免疫组织化学分析表明,与阳性对照组相比,绿茶组、茶多酚组和 EGCG 组 ANP 表达均显著减少 ($P < 0.05$)。说明给予饮茶处理后,ANP 表达明显减少。



2K1C+GT:绿茶组;2K1C+TP:茶多酚组;2K1C+EGCG:EGCG组;2K1C:阳性对照组

图3 绿茶及其有效成分对大鼠左心室心肌 ANP 表达的影响 (×150)

表5 各组大鼠 ANP 平均光密度值的表达水平($\bar{x} \pm s$)

组别	A 值 (n=8)
2KIC	77.92 ±33.47
2KIC+GT	40.30 ±20.44 ^a
2KIC+TP	44.28 ±20.53 ^a
2KIC+EGCG	54.46 ±18.19 ^a

注:与2KIC组相比, a表示 $P < 0.05$ 。

2KIC:阳性对照组;2KIC+GT:绿茶组;2KIC+TP:茶多酚组;
2KIC+EGCG:EGCG组。

3 讨论

高血压病所引起的左心室肥厚已不再被认为是一种生理性适应性代偿过程,而被认为是一种独立心血管病危险因素,它与心脑血管病的发生率及死亡率密切相关^[4]。治疗高血压的目的不仅仅是降低血压,更重要的是保护靶器官功能,降低心脑血管事件的发生率。本研究采用的二肾一夹动物模型(2KIC)是经典的肾性高血压左心室肥厚模型。实验结果显示,大鼠经二肾一夹(2KIC)造模8周后,与假手术组相比,阳性对照组和各饮茶组均明显的左心室肥厚。血压、心脏肥大指数、左心室比体重比值(LVW/BW)、左心室壁厚度均显著增加($P < 0.01$),表明成功地造成了高血压诱发左心室肥厚模型,这与国内外的文献报道一致^[2,5]。但与阳性对照组相比,各个饮茶组LVW/BW、左心室壁厚度明显减小($P < 0.05$)。从形态学上本实验阳性对照组和各个饮茶组均出现左心室壁增厚、重量增加、冠小动脉增厚、血管周围结缔组织增生、心肌细胞不同程度的肥大等肾性高血压心脏的一系列结构及功能变化。但经饮茶处理后有明显的改善。以上结果均提示绿茶、茶多酚和EGCG均对心肌肥大具有一定的抑制作用。但给予饮茶处理后并不能明显地降低大鼠的血压,提示绿茶及其有效成分抑制左心室肥厚的机制并非通过降低机械负荷而产生的。

心肌细胞暴露于致肥大因子后,编码转录因子的即刻早期基因(如 *c-jun*, *c-fos*, *egr1*)出现迅速无特异性的表达短暂。心肌细胞肥大的远期特征为胚胎基因-心房利钠肽(ANP)重新表达,组成型收缩蛋白基因(心肌-肌动蛋白和心室肌球蛋白轻链-2)的表达上调,这在压力超负荷和容量超负荷性心肌肥厚中均可出现;而其他胚胎基因如骨骼肌-肌动蛋白和-肌球蛋白重链(-MHC)表达上调和肌网浆钙ATP酶2表达下调主要见于压力超负荷性心肌肥厚。这些基因表达的改变常用作心肌细胞肥大的实验标志性指标,其中以心房利钠肽基因ANP再表达应用最为普遍。ANP为胚胎期表

达的基因,出生后在正常心肌组织中表达量很低,而如果检测到心肌组织ANP表达量明显增加,则属于胚胎期基因重演,为病理性心肌肥大的可靠指标^[6]。本实验亦观察到肾动脉缩窄后心肌细胞ANP的表达明显增加,主要表现在心肌细胞的胞浆中阳性颗粒显著增加,表明胚胎期基因ANP在大鼠心肌组织中重新表达,发生了心肌肥大。给予饮茶处理后,其胞浆中阳性颗粒明显减少,ANP表达显著降低,心肌肥大标示物基因表达受到抑制,从而对心肌肥大的发生起着预防作用。

许多研究都表明抗氧化治疗在心肌肥大发生过程中发挥着重要的作用。Zheng等^[7]进行的体外实验研究发现,加入EGCG(10, 30, 50 $\mu\text{mol/L}$)后,可明显抑制血管紧张素诱导的血管平滑肌细胞肥大。Priyadarshi等^[8]研究发现,5/6肾切除术诱导的左心室肥大动物模型中,给予0.25%绿茶提取物4周后,有减缓左心室肥大的作用。其作用可能与绿茶及其有效成分的抗氧化作用有关。因而本实验提示,绿茶及其有效成分可有效抑制压力超负荷引起的大鼠左心室肥厚,保护心肌的结构和功能,其作用可能与其抗氧化作用有关,但其确切的分子作用机制有待于进一步研究。

参考文献

- [1] RUWHOF C, VAN DER LAARSE A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 47(1): 23-37.
- [2] NAVAR L G, ZOU L, VON THUN A, et al. Unraveling the mystery of Goldblatt hypertension[J]. *News Physiol Sci*, 1998, 13: 170-176.
- [3] 刘建文. 药理实验方法学——新技术与新方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 196.
- [4] GALIS Z S, KHATRI J J. Matrix metalloproteinase's in vascular remodeling and atherogenesis: The good, the bad, and the ugly[J]. *Circ Res*, 2002, 90(3): 251-262.
- [5] 孙红蕾, 马业新, 张敬群, 等. 缬沙坦对肾血管性高血压大鼠心肌肥厚及结缔组织生长因子表达的影响[J]. *临床心血管病杂志*, 2007, 23(3): 216-218.
- [6] 李小鹰. 心血管疾病分子生物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 172-190.
- [7] ZHENG Y, SONG H J, KIM C H, et al. Inhibitory effect of epigallocatechin 3-O-gallate on vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, 43(2): 200-208.
- [8] PRIYADARSHI S, VALENTIN B, HAN C, et al. Effect of green tea extract on cardiac hypertrophy following 5/6 nephrectomy in the rat [J]. *Kidney Int*, 2003, 63(5): 1785-1790.

[收稿日期:2008-11-15]