

表没食子儿茶素没食子酸酯通过抑制心肌细胞凋亡缓解心肌缺血再灌注损伤的机制研究[△]

符武岛*, 曾敏#, 陈娟, 冯光球, 管频, 钟春荣(海南省人民医院, 海口 570311)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)16-2187-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.16.06

摘要 目的:探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其可能机制。方法:以叔丁基过氧化氢(TBHP)处理H9C2心肌细胞构建缺血再灌注细胞模型,采用MTS法考察经不同剂量(3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 μmol/L)EGCG预处理后细胞的存活情况,并计算细胞存活率;采用Western blotting法检测经不同剂量(100、200 μmol/L)EGCG预处理后细胞中凋亡蛋白(Bcl-2、Bax)的表达情况。将雄性C57BL/6小鼠随机分为假手术组、模型组和EGCG组(5 mg/g),每组15只。假手术组和模型组小鼠均灌胃等体积生理盐水,EGCG组小鼠灌胃相应药物,每日1次,连续7 d。末次给药12 h后,采用前降支结扎法复制心肌缺血再灌注损伤小鼠模型。采用伊文思蓝和TTC双染色法观察各组小鼠的心肌梗死面积,并计算梗死面积占横截面积百分比,采用WST-1法检测其血清超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量,采用Western blotting法检测其心肌组织中凋亡蛋白的表达(Bcl-2、Bax)以及通路相关蛋白[磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、磷酸化PI3K(p-PI3K)、蛋白激酶B(Akt)、磷酸化Akt(p-Akt)]的磷酸化水平。结果:细胞试验结果显示,与对照组比较,模型组细胞存活率、Bcl-2的相对表达量均显著降低,Bax的相对表达量显著升高($P<0.05$);与模型组比较,25、50、100、200 μmol/L EGCG组细胞存活率以及100、200 μmol/L EGCG组细胞Bcl-2的相对表达量均显著升高,100、200 μmol/L EGCG组细胞Bax的相对表达量均显著降低($P<0.05$)。动物实验结果显示,假手术组小鼠未见心肌组织缺血、心腔扩大等现象;模型组小鼠可见明显的心肌梗死现象,其梗死面积占横截面积百分比、血清MDA含量、心肌组织Bax的相对表达量和p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt值均较假手术组显著升高,SOD活性和Bcl-2的相对表达量均较假手术组显著降低($P<0.05$);与模型组比较,EGCG组小鼠心肌梗死面积有所缩小,其梗死面积占横截面积百分比、血清MDA含量、心肌组织Bax的相对表达量和p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt值均显著降低,SOD活性和Bcl-2的相对表达量均显著升高($P<0.05$)。结论:EGCG对心肌缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,这种作用可能与抑制心肌细胞凋亡、改善机体氧化应激状态、调控凋亡蛋白表达、降低PI3K/Akt通路相关蛋白的磷酸化水平有关。

关键词 表没食子儿茶素没食子酸酯;心肌缺血再灌注损伤;凋亡;磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B通路;H9C2心肌细胞;C57BL/6小鼠

Study on Mechanism of Epigallocatechin Gallate Alleviating Myocardial Ischemia-reperfusion Injury by Inhibiting Cardiomyocyte Apoptosis

FU Wudao, ZENG Min, CHEN Juan, FENG Guangqiu, GUAN Pin, ZHONG Chunrong (Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the protective effect and potential mechanism of epigallocatechin gallate (EGCG) on myocardial ischemia-reperfusion injury. METHODS: H9C2 cardiomyocytes were treated with tert-butyl hydroperoxide (TBHP) to establish ischemia-reperfusion cell model. The cell viability was measured by MTS after pretreated with different doses of EGCG (3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μmol/L), and the survival rate was calculated. The expression of apoptotic proteins (Bcl-2, Bax) in cardiomyocytes pretreated with different doses of EGCG (100, 200 μmol/L) were detected by Western blotting. Male C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group, model group and EGCG group (5 mg/g), with 15 mice in each group. Sham operation group and model group were given constant volume of normal saline intragastrically, while EGCG group was given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 7 d. Twelve hours after last medication, myocardial ischemia-reperfusion injury model was established by anterior descending coronary artery ligation. The area of myocardial infarction was observed by double staining of Evan's blue and TTC; the percentage of infarction area to cross-sectional area was calculated; SOD activity and MDA content in serum were determined by WST-1 assay; the expression of apoptotic proteins (Bcl-2, Bax) in myocardial tissue were detected by Western blotting, while the phosphorylation levels of signaling pathway related proteins (PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt) were also detected. RESULTS: Cell test results showed that, compared with control group, survival rate and

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81760054)
* 主治医师,硕士。研究方向:老年心脑血管疾病。电话:0898-68622946。E-mail: fuwudaolw@163.com
通信作者:主任医师,博士。研究方向:心脑血管疾病。电话:0898-68622946。E-mail: hndzm6@126.com

relative expression of Bcl-2 were decreased significantly in model group, while relative expression of Bax was increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, survival rate of cardiomyocyte in 25, 50, 100, 200 μmol/L EGCG groups as well as relative expression of Bcl-2 in 100, 200

$\mu\text{mol/L}$ EGCG groups were increased significantly, while relative expression of Bax in 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ EGCG groups were decreased significantly ($P<0.05$). Animal experiments showed that no ischemia of myocardial tissue and enlargement of cardiac cavity were observed in sham operation group. Myocardial infarction was observed in model group. Compared with sham operation group, percentage of infarction area to cross-sectional area, the serum content of MDA, the relative expression of Bax in myocardial tissue and p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt were increased significantly in model group, while SOD activity and relative expression of Bcl-2 were decreased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, myocardial infarction area of mice in EGCG group was reduced, the percentage of infarction area to cross-sectional area, the serum content of MDA, the relative expression of Bax in myocardial tissue and p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt were significantly decreased, the activity of SOD activity and the relative expression of Bcl-2 were increased significantly ($P<0.05$). CONCLUSIONS: EGCG can protect against myocardial ischemia-reperfusion injury, the mechanism of which may be associated with inhibiting the apoptosis of myocardial cells, improving oxidation stress, regulating the expression of apoptotic protein, reducing the phosphorylation level of PI3K/Akt signaling pathway-related proteins.

KEYWORDS Epigallocatechin gallate; Myocardial ischemia-reperfusion injury; Apoptosis; PI3K/AKT signaling pathway; H9C2 cell; C57BL/6 mice

急性心肌梗死是冠状动脉急性、持续性缺血缺氧所引起的心肌组织坏死。长时间的心肌缺血会导致心肌细胞大量死亡,严重影响患者预后^[1]。近年来,随着溶栓治疗、冠状动脉搭桥以及支架植入术的发展,急性心肌梗死患者的病死率明显降低^[2]。然而,冠状动脉血管再通致缺血再灌注损伤会造成患者心肌细胞受损、心肌梗死面积增大,严重影响其远期预后和心功能改善。既往研究表明,心肌缺血再灌注损伤的潜在病理机制包括自由基损伤、钙超载、白细胞激活和微血管损伤等^[3-5]。目前,临床尚无针对冠状动脉血管再通致缺血再灌注损伤的有效治疗方案,因此寻找针对性的有效治疗药物具有重要的临床意义。

表没食子儿茶素没食子酸酯(Epigallocatechin gallate, EGCG)是绿茶茶多酚的主要组成成分,是从茶叶中分离得到的儿茶素类单体。既往已有大量研究表明,该化合物具有抗肿瘤^[6]、抗肾损伤^[7]、抗衰老^[8]、抗炎^[9]以及抗心肌缺血再灌注损伤^[10]等作用。有研究指出,EGCG是最有效的抗氧化多酚类化合物,可通过有效抑制过氧化氢生成及促进自由基清除等途径来发挥对心肌缺血再灌注损伤的保护作用^[11];同时,该化合物还可通过抗炎和抗凋亡作用来缓解心肌缺血再灌注损伤^[12]。鉴于此,本研究以心肌缺血再灌注损伤模型细胞和模型小鼠为对象,通过 Western blotting 法检测凋亡相关蛋白的表达情况,以明确 EGCG 对心肌缺血再灌注损伤致心肌细胞凋亡的体内、外抑制作用;同时,通过检测心肌细胞内磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路相关蛋白的磷酸化水平来初步探讨其作用机制,以期为临床抗心肌缺血再灌注损伤药物的研发提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Gel DocTMXR+型凝胶成像分析系统、96型水平电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);BC175 型 CO₂ 培养箱(瑞士 Salvis Lab 公司);BBS-SDC 型超净台(博科控股集团有限公司);DB081 型小动物呼吸机(北京智鼠多宝生物科技

有限责任公司);E200 型显微镜(日本 Nikon 公司);MultiskanTM FC 型酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);2000CT 型超声细胞破碎仪(上海左乐仪器有限公司);Centrifuge 5430 型高速离心机(艾本德中国有限公司);EOS 6D 数码相机(日本 Canon 公司)。

1.2 药品与试剂

EGCG 原料药(大连美仑生物技术有限公司,批号:MB1672,纯度:95%);叔丁基过氧化氢(TBHP,美国 Sigma 公司,批号:416665);MTS 检测试剂盒以及兔抗小鼠 Bcl-2、Bax 单克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab197010、ab59348、ab32503);兔抗小鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、PI3K、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、Akt、磷酸化 Akt(p-Akt)单克隆抗体以及山羊抗兔 IgG 二抗(美国 CST 公司,批号分别为 #5174、#4249、#4228、#4685、#4060、#7074);TTC 染色试剂、青链霉素双抗、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 G3005、P1400、P1200);超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20180624、20180623);ECL 化学光试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号:34095);二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0010S);DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 11965-084、25200-056、26400044);伊文思蓝染色试剂[金克隆(北京)生物技术有限公司,批号:YM-S1647];PDVF 膜(美国 Millipore 公司,批号:IPVH00010);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

H9C2 心肌细胞系由中国科学院上海生命科学院细胞资源中心提供。

1.4 动物

清洁级健康 C57BL/6 小鼠,雄性,6~7 周龄,体质量 16~18 g,由温州医科大学提供,动物使用许可证号:SYXK(浙)2015-0009。

2 方法

2.1 细胞试验

2.1.1 细胞模型构建 采用TBHP处理H9C2心肌细胞构建心肌缺血再灌注损伤细胞模型:将细胞接种于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基(以下简称“完全培养基”)中,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中培养(培养条件下同)。取对数生长期的细胞适量,用0.25%胰蛋白酶消化后,以800 r/min离心5 min,收集细胞,用DMEM高糖培养基重悬,以5×10⁴个/mL的密度按2 mL/孔接种至6孔板中,培养48 h。吸弃上清液,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH为7.2~7.4)洗涤2次后,加入100 μmol/L TBHP溶液(以完全培养基为溶剂,剂量根据本研究前期预试验确定)500 μL,培养12 h,造成缺氧;随后换用完全培养基,继续培养,进行再灌注。

2.1.2 细胞存活率检测 采用MTS法检测。取对数生长期的细胞适量,以2.5×10⁴个/mL的密度按200 μL/孔接种至96孔板中,培养48 h。将细胞随机分为对照组、模型组和EGCG不同剂量组(参照本课题组前期预试验结果,剂量分别为3.125、6.25、12.5、25、50、100、200 μmol/L),每组设6个复孔。吸弃各孔上清液,对照组和模型组加入完全培养基0.5 mL,各给药组加入含相应药物的完全培养基0.5 mL,继续培养30 min。除对照组外,其余各组细胞均按“2.1.1”项下方法复制心肌缺血再灌注损伤模型。再灌注3 h后,每孔加入MTS溶液(以DMEM高糖培养基为溶剂)100 μL,培养3 h后,使用酶标仪于490 nm波长处检测各孔的吸光度值,并计算细胞存活率(细胞存活率=试验组细胞平均吸光度值/对照组细胞平均吸光度值×100%)。上述试验重复3次。

2.1.3 凋亡蛋白表达量检测 采用Western blotting法检测。取对数生长期的细胞适量,以5×10⁴个/mL的密度按2 mL/孔接种至6孔板中,培养24 h。将细胞随机分为对照组、模型组和EGCG低、高剂量组(100、200 μmol/L,剂量设置参考“2.1.2”项检测结果),每组设3个复孔。吸取各孔上清液,对照组和模型组加入完全培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的完全培养基2 mL,继续培养48 h。除对照组外,其余各组细胞均按“2.1.1”项下方法复制心肌缺血再灌注损伤模型。再灌注3 h后,裂解细胞,采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白经变性后,进行SDS-PAGE电泳,然后转移至PVDF膜上,以5%脱脂奶粉室温封闭2 h,用TBST溶液洗膜10 min×3次;加入相应一抗[GAPDH的稀释度为1:5 000, Bcl-2、Bax的稀释度均为1:1 000],4℃孵育过夜;用TBST溶液洗膜10 min×3次,加入相应二抗(稀释度为1:5 000),室温孵育2 h;TBST溶液洗膜10 min×3次,以ECL试剂显色后,置于凝胶成像系统上成像,并使用Image Lab 5.2.1软件分析。Bcl-2、Bax的相对表达量以其与内参(GAPDH)条带的灰度值比值来表示。上述试验重复3次。

2.2 动物实验

2.2.1 分组、造模与给药 所有小鼠均适应性喂养1周

后,随机分为假手术组、模型组和EGCG组(5 mg/g,以生理盐水为溶剂;剂量参照前期预试验结果),每组15只。假手术组和模型组小鼠均灌胃等体积生理盐水,EGCG组小鼠灌胃相应药物,每日1次,连续7 d。末次给药12 h后,采用前降支结扎法复制心肌缺血再灌注损伤小鼠模型:小鼠吸入异氟烷(3 mL/kg)进行麻醉,以仰卧位固定,切开气管,连接小动物呼吸机辅助呼吸(呼吸频率:80次/min,潮气量:100 mL,呼吸时间比:1:1)。采用7/0号缝合线于小鼠左侧第4肋间入胸,并以滑结结扎冠状动脉左前降支,造成缺血30 min;然后解开滑结,恢复再灌注4 h,建立心肌缺血再灌注损伤模型。假手术组用7/0缝合线穿过左前降支而不结扎,其余操作同上。

2.2.2 心肌梗死面积检测 采用伊文思蓝和TTC双染色法检测。取各组小鼠6只,于下腔静脉注射2%伊文思蓝染色试剂0.2 mL后,脱颈处死,剖开胸腔,暴露心脏,当心脏右侧变蓝时,迅速取出心脏,用生理盐水冲洗,置于-20℃冷冻保存。制备厚约1 mm的心脏切片5片,置于1%TTC染料中,于37℃孵育20 min。用相机拍照后,采用Image J 1.52软件分析[伊文思蓝染色的非缺血性心肌呈深蓝色,梗死区(INF)则呈苍白色;TTC染色后呈淡红色的活组织被定义为危险区(AAR)],并计算同一切面内心肌梗死面积占横截面积百分比(即INF与切片横截总面积的比值)。

2.2.3 血清指标检测 取各组余下9只小鼠,均摘除眼球取血,室温放置1 h后,于4℃下以2 000 r/min离心10 min,分离血清。严格按照相应试剂盒说明书操作,采用WST-1法以酶标仪检测小鼠血清中SOD的活性及MDA的含量。

2.2.4 心脏组织中凋亡蛋白表达量及通路相关蛋白磷酸化水平检测 采用Western blotting法检测。取“2.2.3”项下各组小鼠心脏组织适量,匀浆,以12 000 r/min离心10 min,超声(功率:250 W,频率:25 kHz)粉碎,以12 000 r/min离心30 min,取上清液,采用BCA法测定蛋白浓度。蛋白经变性后,进行SDS-PAGE电泳,电泳后转移至PVDF膜上,以5%脱脂奶粉室温封闭2 h,用TBST溶液洗膜10 min×3次,加入相应一抗[GAPD的稀释度为1:5 000,其余蛋白的稀释度均为1:1 000],4℃孵育过夜;用TBST溶液洗膜10 min×3次,加入相应二抗(1:5 000),室温孵育2 h;TBST溶液洗膜10 min×3次,以ECL试剂显色后,置于凝胶成像系统上成像,并使用Image Lab 5.2.1软件分析。凋亡蛋白(Bcl-2、Bax)的相对表达量以其与内参(GAPDH)条带的灰度值比值来表示,PI3K/Akt通路相关蛋白的磷酸化水平以p-PI3K与PI3K、p-Akt与Akt条带的灰度值比值(即p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt值)来表示。上述实验重复3次。

2.3 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两组间比较采用Bonferroni校正的

t检验。P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞试验结果

3.1.1 EGCG对H9C2心肌细胞存活率的影响 与对照组比较,模型组细胞存活率显著降低,差异有统计学意义(P<0.05)。与模型组比较,25、50、100、200 μmol/L EGCG组细胞存活率均显著升高,差异均有统计学意义(P<0.05),详见表1。本研究选择100、200 μmol/L作为后续细胞试验剂量。

表1 EGCG对H9C2心肌细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effects of EGCG on survival rate of H9C2 cardiomyocytes($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %
对照组	1.00±0.01	25 μmol/L EGCG组	0.68±0.04 [#]
模型组	0.57±0.04 [*]	50 μmol/L EGCG组	0.72±0.01 [#]
3.125 μmol/L EGCG组	0.59±0.04	100 μmol/L EGCG组	0.83±0.04 [#]
6.25 μmol/L EGCG组	0.62±0.03	200 μmol/L EGCG组	0.84±0.03 [#]
12.5 μmol/L EGCG组	0.64±0.03		

注:与对照组比较, *P<0.05;与模型组比较, [#]P<0.05

Note: vs. control group, *P<0.05; vs. model group, [#]P<0.05

3.1.2 EGCG对H9C2心肌细胞凋亡蛋白表达量的影响 与对照组比较,模型组细胞中Bcl-2的相对表达量显著降低,Bax的相对表达量显著升高,差异均有统计学意义(P<0.05);与模型组比较,EGCG各剂量组细胞中Bcl-2的相对表达量均显著升高,Bax的相对表达量均显著降低,差异均有统计学意义(P<0.05),详见图1、表2。

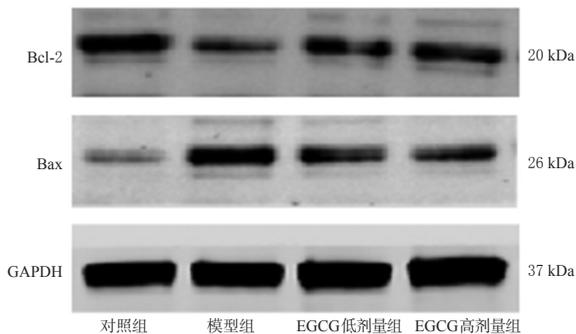


图1 EGCG对H9C2心肌细胞中Bcl-2、Bax蛋白相对表达量影响的电泳图

Fig 1 Electrophoretic diagrams of the effects of EGCG on the relative expression of Bcl-2 and Bax proteins in H9C2 cardiomyocytes

3.2 动物实验结果

3.2.1 EGCG对模型小鼠心肌梗死面积的影响 假手术组小鼠心肌组织无缺血表现,心腔未扩大;模型组小鼠心肌组织可见明显梗死现象,其梗死面积占横截面积百分比显著升高,差异有统计学意义(P<0.05);EGCG组小鼠心肌梗死面积明显减小,其梗死面积占横截面积百分比显著降低,差异有统计学意义(P<0.05),详见图2(图中,“→”表示INF,“⇌”表示非缺血性心肌组织)、表3。

表2 EGCG对H9C2心肌细胞中Bcl-2、Bax蛋白表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of EGCG on the expression of Bcl-2 and Bax proteins in H9C2 cardiomyocytes($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Bcl-2	Bax
对照组	0.92±0.02	0.12±0.01
模型组	0.16±0.01 [*]	0.93±0.03 [*]
EGCG低剂量组	0.36±0.02 [#]	0.72±0.04 [#]
EGCG高剂量组	0.39±0.01 [#]	0.36±0.02 [#]

注:与对照组比较, *P<0.05;与模型组比较, [#]P<0.05

Note: vs. control group, *P<0.05; vs. model group, [#]P<0.05

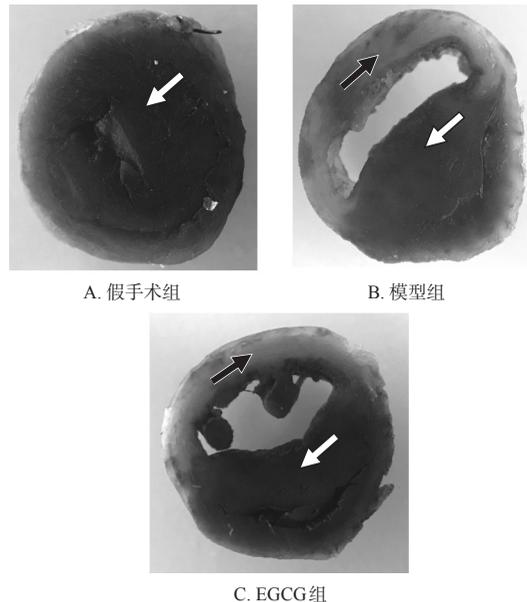


图2 EGCG对心肌缺血再灌注损伤模型小鼠心肌组织梗死面积影响的观察图(伊文思蓝和TTC双染色法)

Fig 2 Observational maps of the effects of EGCG on myocardial infarction area in mice with myocardial ischemia-reperfusion injury (double staining of Evan's blue and TTC)

表3 EGCG对心肌缺血再灌注损伤模型小鼠心肌梗死面积以及血清氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Effects of EGCG on myocardial infarction area and serum oxidation stress indexes in mice with myocardial ischemia-reperfusion injury($\bar{x} \pm s$)

组别	梗死面积占横截面积百分比(n=6), %	SOD(n=9), U/mL	MDA(n=9), nmol/L
假手术组	0	4.61±0.27	126.32±7.91
模型组	48.12±4.21 [*]	1.50±0.13 [*]	202.31±7.21 [*]
EGCG组	38.51±3.52 [#]	2.32±0.17 [#]	156.22±8.53 [#]

注:与假手术组比较, *P<0.05;与模型组比较, [#]P<0.05

Note: vs. sham operation group, *P<0.05; vs. model group, [#]P<0.05

3.2.2 EGCG对模型小鼠血清SOD活性以及MDA含量的影响 与假手术组比较,模型组小鼠血清SOD活性显

著降低,MDA 含量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,EGCG 组小鼠 SOD 活性显著升高,MDA 含量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见表 3。

3.2.3 EGCG 对心肌组织中凋亡蛋白表达量及通路相关蛋白磷酸化水平的影响 与假手术组比较,模型组小鼠心肌组织中 Bax 的相对表达量以及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 值均显著升高,Bcl-2 的相对表达量显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,EGCG 组小鼠心肌组织中 Bax 的相对表达量以及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 值均显著降低,Bcl-2 的相对表达量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见图 3、表 4。

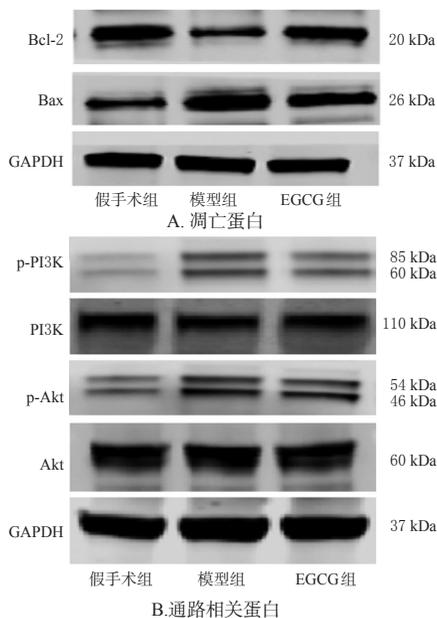


图 3 EGCG 对心肌缺血再灌注损伤模型小鼠心肌组织中凋亡蛋白表达量及通路相关蛋白磷酸化水平影响的电泳图

Fig 3 Electrophoretic diagrams of the effects of EGCG on the expression of myocardial apoptosis proteins and phosphorylation level of signaling pathway related proteins in mice with myocardial ischemia-reperfusion injury

4 讨论

随着发病率和致死率的逐年攀升,急性心肌梗死已成为严重威胁人们生命安全的疾病之一,该症的主要治疗原则是在心肌梗死发病的早期对其进行干预,干预手段包括药物溶栓、支架植入和外科搭桥手术等^[13]。但是,对于冠状动脉血管再通(即心肌缺血再灌注)所导致的损伤,临床尚无有效的治疗方法,严重影响了患者的预后。EGCG 作为绿茶茶多酚的主要组成成分,已有大量研究证实其在不同组织缺血再灌注损伤中发挥了重要作用:He J 等^[14]研究表明,EGCG 是最有效的抗氧化多酚,可有效抵抗过氧化氢生成,从而发挥对心肌组织的保护作用;Lv J 等^[15]研究表明,EGCG 可通过抑制炎症反

表 4 EGCG 对心肌缺血再灌注损伤模型小鼠心肌组织中凋亡蛋白表达量及通路相关蛋白磷酸化水平的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

Tab 4 Effects of EGCG on the expression of myocardial apoptosis proteins and phosphorylation level of signaling pathway related proteins in mice with myocardial ischemia-reperfusion injury($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	Bcl-2	Bax	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
假手术组	1.20 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.13 ± 0.01
模型组	0.25 ± 0.01*	1.12 ± 0.03*	1.13 ± 0.03*	0.89 ± 0.03*
EGCG 组	0.76 ± 0.03#	0.86 ± 0.02#	0.73 ± 0.04#	0.60 ± 0.08#

注:与假手术组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, * $P < 0.05$; vs. model group, # $P < 0.05$

应和细胞凋亡来减少肾组织的缺血再灌注损伤;Zhang F 等^[10]研究表明,EGCG 可通过抑制炎症反应来发挥对大鼠脑缺血再灌注损伤的神经保护作用。由此可见,EGCG 具有一定的抗缺血再灌注损伤的药理基础。为此,本研究通过构建心肌缺血再灌注损伤细胞和动物模型,初步考察了 EGCG 的保护作用及可能机制。

在哺乳动物中,Bcl-2 蛋白及其编码基因在细胞凋亡调控过程中具有重要作用,其过度表达可减少氧自由基的产生和脂质过氧化物的形成,从而抑制细胞凋亡^[16]。Bax 为促凋亡因子,其促凋亡作用与诱导胱天蛋白酶(Caspase)的释放有关^[17]。由此可见,Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的改变可用以评估心肌细胞凋亡水平的变化。PI3K/Akt 通路是调控细胞凋亡的重要信号通路之一,PI3K、Akt 蛋白磷酸化水平的升高会上调心肌细胞中 Bax 蛋白的表达,同时下调 Bcl-2 蛋白的表达,从而加速心肌缺血再灌注损伤所致的心肌细胞凋亡^[18]。SOD 可消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质;而 MDA 是细胞膜脂质过氧化作用的产物之一,其可加剧细胞膜损伤,可作为评估脂质过氧化程度的重要指标^[19]。细胞试验结果显示,模型组细胞存活率和 Bcl-2 相对表达量均较对照组显著降低,而 Bax 的相对表达量则显著升高,提示细胞受到缺血再灌注损伤,并出现凋亡。与模型组比较,5、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组细胞存活率以及 100、200 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组细胞中 Bcl-2 的相对表达量均显著升高,而 100、200 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组细胞中 Bax 的相对表达量均显著降低,提示 EGCG 可抑制心肌缺血再灌注损伤所导致的细胞凋亡,且这种作用与调控凋亡蛋白的表达有关。结合体外试验结果,本研究以心肌缺血再灌注损伤模型小鼠为对象,进一步考察了 EGCG 对其心肌细胞的保护作用及可能机制。结果显示,假手术组小鼠未见心肌组织缺血及心腔扩大等现象;模型组小鼠可见明显的心肌梗死现象,其心肌梗死面积占横截面积百分比、血清 MDA 含量、心肌组织中 Bax 相对表达量以及 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 值均显著

升高,血清SOD活性和心肌组织中Bcl-2的相对表达量均显著降低,提示发生心肌缺血再灌注损伤时,小鼠体内氧化应激水平、凋亡蛋白及PI3K/Akt通路相关蛋白的表达均受到明显影响,模型复制成功。与模型组比较,EGCG组小鼠心肌梗死面积有所减小,其梗死面积占横截面积百分比、血清MDA含量、心肌组织中Bax相对表达量以及p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt值均显著降低,血清SOD活性和心肌组织中Bcl-2的相对表达量均显著升高,提示EGCG可通过改善机体氧化应激状态、调控凋亡蛋白表达、降低PI3K/Akt通路相关蛋白的磷酸化水平等途径来发挥对模型小鼠的保护作用。

综上所述,EGCG对心肌缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,这种作用可能与抑制心肌细胞凋亡、改善机体氧化应激状态、调控凋亡蛋白表达、降低PI3K/Akt通路相关蛋白的磷酸化水平有关。但本研究体内实验只设置了单一剂量组,且并未设置PI3K/Akt通路激动剂或抑制剂作为对照,故所得结论尚有待后续研究予以确证。

参考文献

[1] LANSKY AJ, STONE GW. Periprocedural myocardial infarction: prevalence, prognosis, and prevention[J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2010, 3(6):602-610.

[2] FARHAT N, HADDAD N, CRISPO J, et al. Trends in concomitant clopidogrel and proton pump inhibitor treatment among ACS inpatients, 2000-2016[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2019, 75(2):227-235.

[3] BELLANTI F, MIRABELLA L, MITAROTONDA D, et al. Propofol but not sevoflurane prevents mitochondrial dysfunction and oxidative stress by limiting HIF-1 α activation in hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.002.

[4] ZHANG L, CAO S, DENG S, et al. Ischemic postconditioning and pinacidil suppress calcium overload in anoxia-reoxygenation cardiomyocytes via down-regulation of the calcium-sensing receptor[J]. *PeerJ*, 2016. DOI:10.7717/peerj.2612.

[5] DE GUSMÃO FM, BECKER C, CARVALHO MH, et al. Angiotensin II inhibition during myocardial ischemia-reperfusion in dogs: effects on leukocyte infiltration, nitric oxide synthase isoenzymes activity and left ventricular ejection fraction[J]. *Int J Cardiol*, 2005, 100(3):363-370.

[6] LA X, ZHANG L, LI Z, et al. (-)-Epigallocatechin gallate (EGCG) enhances the sensitivity of colorectal cancer cells to 5-FU by inhibiting GRP78/NF- κ B/miR-155-5p/MDR1 pathway[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(9):2510-2518.

[7] CHEN LL, XU Y. Epigallocatechin gallate attenuates uric acid-induced injury in rat renal interstitial fibroblasts NRK-49F by up-regulation of miR-9[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(21):7458-7469.

[8] KUMAR R, SHARMA A, KUMARI A, et al. Epigallocatechin gallate suppresses premature senescence of preadipocytes by inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway and induces senescent cell death by regulation of Bax/Bcl-2 pathway[J]. *Biogerontology*, 2019, 20(2):171-189.

[9] JHANG JJ, LU CC, YEN GC. Epigallocatechin gallate inhibits urate crystals-induced peritoneal inflammation in C57BL/6 mice[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(10):2297-2303.

[10] ZHANG F, LI N, JIANG L, et al. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through attenuation of inflammation[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(8):1691-1698.

[11] AN Z, QI Y, HUANG D, et al. EGCG inhibits Cd²⁺-induced apoptosis through scavenging ROS rather than chelating Cd²⁺ in HL-7702 cells[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2014, 24(4):259-267.

[12] CERESO-GUISADO MI, ZUR R, LORENZO MJ, et al. Implication of Akt, ERK1/2 and alternative p38 MAPK signaling pathways in human colon cancer cell apoptosis induced by green tea EGCG[J]. *Food Chem Toxicol*, 2015. DOI:10.1016/j.fct.2015.08.017.

[13] REDDY K, KHALIQ A, HENNING RJ. Recent advances in the diagnosis and treatment of acute myocardial infarction[J]. *World J Cardiol*, 2015, 7(5):243-276.

[14] HE J, XU L, YANG L, et al. Epigallocatechin gallate is the most effective catechin against antioxidant stress via hydrogen peroxide and radical scavenging activity[J]. *Med Sci Monit*, 2018. DOI:10.12659/MSM.911175.

[15] LV J, FENG M, ZHANG L, et al. Protective effect of epigallocatechin gallate, a major constituent of green tea, against renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Int Urol Nephrol*, 2015, 47(8):1429-1435.

[16] WARREN CFA, WONG-BROWN MW, BOWDEN NA. Bcl-2 family isoforms in apoptosis and cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2019. DOI:10.1038/s41419-019-1407-6.

[17] PEÑA-BLANCO A, GARCÍA-SÁEZ AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis[J]. *FEBS J*, 2018, 285(3):416-431.

[18] SONG HP, CHU ZG, ZHANG DX, et al. PI3K-Akt pathway protects cardiomyocytes against hypoxia-induced apoptosis by MitoKATP-mediated mitochondrial translocation of p-Akt[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(2):717-727.

[19] YANG Y, WU ZZ, CHENG YL, et al. Resveratrol protects against oxidative damage of retinal pigment epithelium cells by modulating SOD/MDA activity and activating Bcl-2 expression[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(1):378-388.

(收稿日期:2019-02-28 修回日期:2019-06-17)

(编辑:张元媛)