

## 表没食子儿茶素没食子酸酯通过下调 Toll 样受体 4 对高盐诱导大鼠高血压的降压作用

金 峰<sup>1</sup>, 祁 昊<sup>1</sup>, 张 杰<sup>2</sup>

1. 河南省人民医院省直第一医院, 河南 郑州 450003

2. 上海中医药大学, 上海 201203

**摘要:** **目的** 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对高盐引起的高血压模型大鼠的降压作用及作用机制。**方法** 大鼠随机分为对照组、模型组和 EGCG 50、100 mg/kg 组,测定大鼠的大鼠平均动脉压,并采用 Western blotting 印迹法检测大鼠下丘脑室旁核(PVN)中 Toll 样受体 4(TLR4)、核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) p65、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的水平;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测大鼠 PVN 中单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和 IL-6 水平。**结果** 高盐诱导的高血压模型大鼠中 TLR4 表达量明显增加( $P < 0.05$ )。EGCG 50、100 mg/kg 显著降低大鼠的平均动脉压( $P < 0.05$ ),并明显降低 PVN 中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  水平( $P < 0.05$ )。**结论** EGCG 可降低高盐诱导大鼠的高血压,其机制可能与阻断 TLR4 信号有关。

**关键词:** 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG); 高血压; Toll 样受体 4; 核因子  $\kappa$ B p65; 单核细胞趋化蛋白 1

**中图分类号:** R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2020)04-0636-05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.04.007

## Antihypertensive effect of epigallocatechin gallate on high salt induced hypertensive rats by down-regulating toll-like receptor 4

JIN Feng<sup>1</sup>, QI Hao<sup>1</sup>, ZHANG Jie<sup>2</sup>

1. The First Directly Affiliated Hospital of Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450003, China

2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**Abstract: Objective** To study the antihypertensive effect and mechanism of epigallocatechin gallate (EGCG) on hypertensive rats induced by high salt. **Methods** The rats were randomly divided into control group, model group, EGCG 50 and 100 mg/kg groups. The mean arterial pressure was recorded. TLR4, NF- $\kappa$ B p65, and IL-1 $\beta$  levels in PVN of rats treated with high salt were measured by Western blotting analysis. And the IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  levels were detected by ELISA method. **Results** The expression of TLR4 increased significantly in hypertension rats induced by high salt ( $P < 0.05$ ). EGCG 50 and 100 mg/kg could significantly decrease the mean arterial pressure of rats ( $P < 0.05$ ), and could significantly reduce the expression of TLR4, NF- $\kappa$ B p65, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  levels in PVN of rats treated with high salt. **Conclusion** EGCG can reduce blood pressure in hypertensive rats induced by high salt, and its mechanism may be related to blocking TLR4 signaling.

**Key words:** epigallocatechin gallate (EGCG); hypertension; TLR4; NF- $\kappa$ B p65; MCP-1

高血压是一种临床综合征,它以体循环动脉血压持续增高为主要特征,可能伴有心脏、脑、肾脏等器官的功能或器质性损害<sup>[1]</sup>。高血压通常情况下不会引起症状,然而,长期高血压可增加冠状动脉疾病、中风、心力衰竭、心房颤动、外周血管疾病、

视力丧失、慢性肾脏疾病等的发病机率。重度高血压更是导致心脑血管疾病、肾脏病发生和死亡的主要因素之一<sup>[2]</sup>。因此寻找高效、低毒、特异性的降压药是高血压病领域的研究重点。高血压可能引起慢性炎症、氧化应激和交感神经紧张等现象<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2020-02-24

基金项目: 河南省省部共建项目(SBGJ2018070)

作者简介: 金 峰,男,主治医师,研究方向为高血压。E-mail: 1099372244@qq.com

Toll样受体4 (TLR4) 在高血压引起的炎症和氧化应激过程中具有重要作用<sup>[4]</sup>。但是, TLR4 与高血压的发生、发展及其机制尚不清楚。TLR4 是自然免疫系统的重要受体, 对多种感染因子和应激反应有反应。TLR4 信号激活是由核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 激活的促炎细胞因子 (PICS) 表达增加引起的, 并导致以产生 PICS 为特征的炎症过程, 如白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、IL-6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )。很明显, 中枢神经系统在高血压炎症中起着重要作用<sup>[5]</sup>。中枢神经系统下丘脑室旁核 (PVN) 内 PICS 水平的增加是高血压发病的关键。阻断 PVN 中的 TLR4 可以减缓血管紧张素 II 引起的高血压的发展。因此, TLR4 参与了包括高血压在内的心血管疾病的发展。但 TLR4 在高血压发生发展中的作用机制尚不清楚。

表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 是药食同源植物绿茶中含有含量最高的儿茶素化合物, 占绿茶毛重的约 10%。EGCG 结构中含有多个酚羟基, 化学结构见图 1, 具有很强的抗氧化活性, 是茶叶中抗氧化能力最强的化合物之一, 抗氧化活性远远强于维生素 C 和维生素 E<sup>[6]</sup>。近年来研究发现 EGCG 在多种疾病治疗中可能发挥重要的作用, 受到日益增加的关注<sup>[7-10]</sup>。本研究通过建立高盐诱导的高血压大鼠模型, 评价 EGCG 的降血压活性, 测定 EGCG 对大鼠体内 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 水平等的影响, 以确定 EGCG 对高血压和 TLR4 的作用, 为揭示 EGCG 的降压活性和作用机制以及可能的临床应用前景提供理论依据。

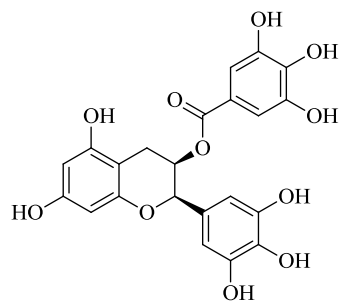


图1 EGCG 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of EGCG

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康成年 SPF 级 SD 大鼠, 雌雄各半, 体质量

为 180~200 g, 购买自北京市维通利华实验动物中心, 动物使用许可证号 SCXK (京) 2015-0001。所有动物实验均遵循实验动物的伦理要求和实验动物管理条例。

### 1.2 药品和试剂

EGCG (质量分数  $\geq 95\%$ , 产品批号 E4143) 购自美国 Sigma 公司; 氯化钠、氯胺酮、甲苯噻嗪均购自美国 Sigma 公司; 实验所用抗体包括 NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$ 、NOX2、NOX4、SOD、TH、GAD67 和 GAPDH 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; ELISA 试剂盒 (货号 BMS223HS、BMS213HS) 购自赛默飞世尔科技中国有限公司; 细胞总蛋白抽提试剂盒 (货号 R0121) 购于上海碧云天生物技术有限公司; 其他试剂 (分析纯) 购于北京试剂厂。磷酸盐缓冲液 (PBS) 为本实验室配制; 蒸馏水由 Milli-Q 超纯水系统制得。

### 1.3 仪器

X-20 减震型闭循环低温恒温器 (天津多为莱博科技有限公司); Leica CM1520 冰冻切片机 (徕卡显微系统上海贸易有限公司); DW-86L30 超低温冰箱 (杭州艾普仪器设备有限公司); DYCZ-24KS 型双板垂直电泳仪 (北京六一仪器厂); Muromachi 尾套法血压测定仪 (香港生科仪有限公司); 微孔板读数仪 (赛默飞世尔科技中国有限公司); HNY-200B 台式全温度恒温高速培养摇床 (北京傲松欣实验室设备有限公司); Eppendorf-5424 小型高速离心机 (北京东南仪诚实验室设备有限公司); Olympus SZ61/51 体视显微镜 (奥林巴斯北京服务有限公司); Milli-Q 超纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

### 1.4 高血压大鼠模型的建立

大鼠适应性饲养 1 周后, 随机选取 15 只为正常组; 其余 60 只为高血压模型组。其中正常组大鼠给予 0.3% 氯化钠溶液, 高血压模型组给予 8% 氯化钠溶液, 处理时间均为 12 周。各组大鼠喂养至第 12 周结束时统一测量血压, 模型组按收缩压 SBP  $> 130$  mmHg (1 mmHg = 133 Pa) 的标准筛选达标大鼠。凡血压已达标大鼠, 改饲普通饲料 1 周后, 再次测量血压仍达标者为建模成功<sup>[11]</sup>。筛选出符合标准的高盐高血压大鼠模型组 30 只与正常组大鼠均给予普通饲料, 继续喂养 4 周。

### 1.5 分组给药及手术处理

将大鼠分为 4 组: 对照组、模型组和 EGCG 50、100 mg/kg 组。给药时间为每日 9:00 时。对照组、

模型组给予生理盐水, EGCG 组的剂量选择依据文献报道<sup>[12]</sup>。各组动物经生理盐水或 EGCG 干预 4 周后, 给予氯胺酮 (80 mg/kg) 和甲苯噻嗪 (10 mg/kg) 混合物麻醉, 取脑后立即在干冰上冷冻。

### 1.6 EGCG 对高盐诱导高血压大鼠平均动脉压的影响

应用 NIBP 非侵入式计算机尾套系统对清醒大鼠尾部动脉血压进行测量。测量至少 7 d 的每日血压, 记录每只大鼠的平均动脉血压。测定血压前确定大鼠已适应环境, 以减少应激诱导血压变化和防止血压波动。

### 1.7 EGCG 对高盐诱导高血压大鼠 PVN 中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$ 表达的影响

将大鼠大脑 300  $\mu$ m 切片, 在低温恒温器中分离 PVN 组织。PVN 组织保存在 -80  $^{\circ}$ C, 用 Western blotting 印迹法检测蛋白水平表达。将蛋白提取物 (40  $\mu$ g) 与等量的 5 $\times$ 缓冲液混合, 煮沸 5 min, 并在 10%~15%SDS 聚丙烯酰胺凝胶上电泳。然后将蛋白质电沉积到聚偏氟乙烯膜上。非特异性结合通过在 1%酪蛋白在磷酸盐缓冲盐水中孵育 1 h 在室温中被阻断。然后在 4  $^{\circ}$ C 下用一级抗体 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$  孵育印迹, 以 GAPDH 为内标, 用 NIH 图像 J 软件对条带密度进行分析。

### 1.8 EGCG 对高盐诱导高血压大鼠 PVN 中 MCP-1、TNF- $\alpha$ 和 IL-6 水平的影响

根据厂家的说明书, 采用市售大鼠酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒对 MCP-1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 进行定量。将微量滴定板的固相与样品 10  $\mu$ L 结合, 其浓度用 450 nm 的微板读数仪测定。所有样品均重复检测 3 次以上。

### 1.9 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计处理。计量资料数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用  $t$  检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 高盐饮食对大鼠体内 TLR4 表达量的影响

与低盐组比较, 第 12、16 周高盐饮食大鼠 PVN 中 TLR4 的表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ); 而高盐处理大鼠 12 或 16 周, 大鼠 PVN 中 TLR4 的表达量无明显差异。见图 2。

### 2.2 EGCG 对高盐诱导大鼠平均动脉压的影响

与对照组比较, 模型组大鼠体质量比较差异无

统计学意义, 平均动脉血压显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, EGCG 50、100 mg/kg 组大鼠体质量比较差异无统计学意义, 平均动脉压明显下降 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

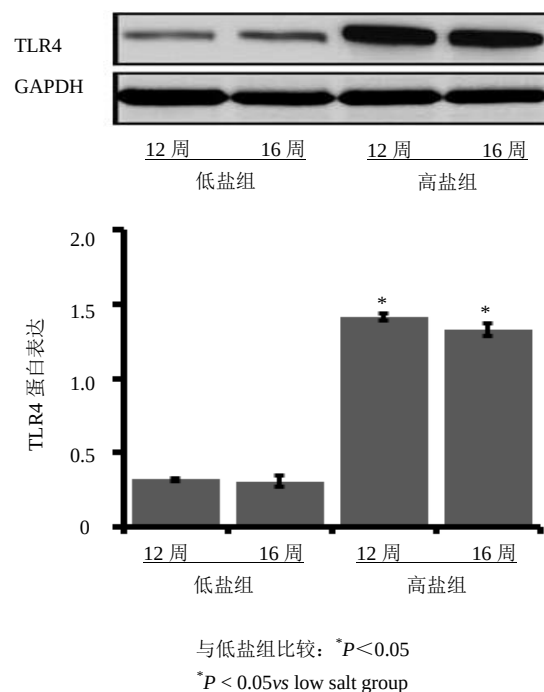


图2 高盐饮食对大鼠体内 TLR4 表达量的影响

Fig. 2 Effects of high salt diet on expression levels of TLR4 in rats

表1 EGCG 对高盐诱导高血压大鼠平均动脉压的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )

Table 1 Effects of EGCG on mean arterial pressure of rats treated with high salt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )

| 组别   | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 体质量/mg   | 平均动脉压/mmHg            |
|------|---------------------------|----------|-----------------------|
| 对照   | —                         | 345 ± 18 | 95 ± 8                |
| 模型   | —                         | 342 ± 22 | 133 ± 11 <sup>#</sup> |
| EGCG | 50                        | 346 ± 17 | 101 ± 9*              |
|      | 100                       | 344 ± 20 | 97 ± 16*              |

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  (1 mmHg = 133 Pa)

<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group (1 mmHg = 133 Pa)

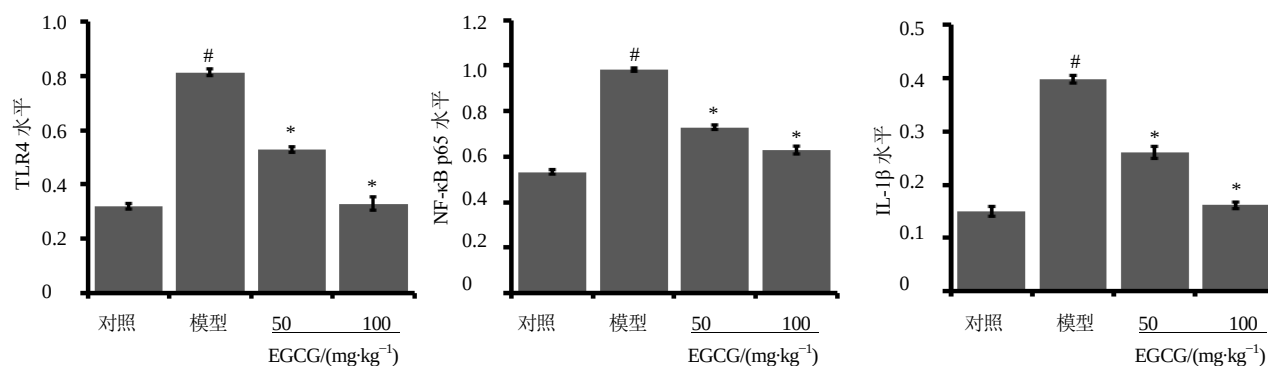
### 2.3 EGCG 对高盐诱导高血压大鼠 PVN 中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$ 表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 PVN 内 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$  的表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, EGCG 50、100 mg/kg 组大鼠 PVN 内 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$  的表达水平显著下降, 两组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量相关性, 见图 3。

## 2.4 EGCG 对高盐诱导高血压大鼠 PVN 中 MCP-1、TNF- $\alpha$ 和 IL-6 水平的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 PVN 内 MCP-1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的表达水平显著升高( $P < 0.05$ );

与模型组比较, EGCG 50、100 mg/kg 组大鼠 PVN 内 MCP-1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达水平显著下降, 两组比较差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量相关性, 见图 4。

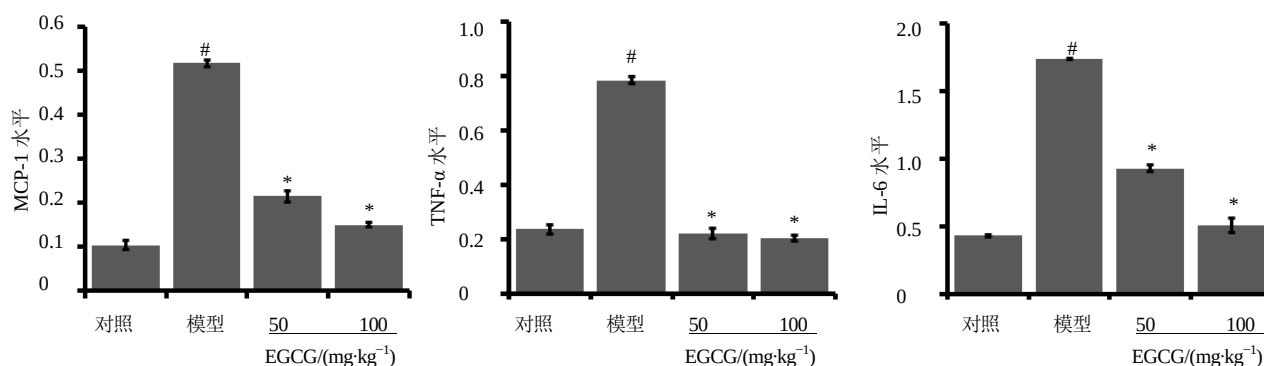


与对照组比较: # $P < 0.05$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$

# $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group

图3 EGCG 对高盐诱导高血压大鼠 PVN 中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-1 $\beta$  表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )

Fig. 3 Effects of EGCG on expression levels of TLR4, NF- $\kappa$ B p65, and IL-1 $\beta$  in PVN of rats treated with high salt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )



与对照组比较: # $P < 0.05$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$

# $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group

图4 EGCG 对高盐诱导高血压大鼠 PVN 中 MCP-1、TNF- $\alpha$  和 IL-6 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )

Fig. 4 Effects of EGCG on expression levels of MCP-1, TNF- $\alpha$ , and IL-6 in PVN of rats treated with high salt ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )

## 3 讨论

TLR4 在心血管疾病的发展中发挥作用。高血压模型动物心脏和 PVN 中的 TLR4 升高, 而 TLR4 的通路阻断可下调炎性分子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ , 减弱交感神经活性和降低血压。研究表明在高血压大鼠中, AT1-R 拮抗剂通过 TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B 信号途径降低高血压及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的表达<sup>[13]</sup>。然而, TLR4 在高血压发病中的作用机制尚不清楚。本研究发现, 与正常血压大鼠相比, 高盐诱导高血压大鼠的 TLR4 表达明显增加。那么, 是什么激活

了 TLR4 呢, 研究人员已经报道了高盐饮食与自身免疫之间的联系, 因为高盐饮食可以加速自身免疫活动<sup>[14]</sup>。最近的证据表明大量的钠存储在间质中, 这种未被理解的电解质积累诱导补偿性局部调节淋巴间隙清除机制和单核吞噬细胞系统细胞和 T 细胞的平行反应。NLRP3 是另一种已知的胞质内模式识别受体, 高盐引起 NLRP3 蛋白水平的短暂增加和适度的 NLRP3 炎性体激活<sup>[15]</sup>。因此, 推测高盐环境可以激活免疫系统和 TLR4, 这在本研究中被初步证实, 需要进一步探讨和讨论。

本研究还发现 EGCG 降低了血压、TLR4、NF- $\kappa$ B p65、促炎细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  的表达。这些结果与高血压大鼠 ROS、兴奋性和抑制性神经递质的减少有关。兴奋性和抑制性神经递质被证明有助于交感神经活动。这与脑细胞因子引起心衰大鼠 PVN 兴奋性和抑制性神经递质失衡, 导致交感神经兴奋的结果一致。

综上所述, EGCG 能显著降低高盐引起大鼠的血压升高, 且这种作用与抑制 TLR4 激活呈正相关。这一新发现为 EGCG 的临床应用提供了参考, 也为 EGCG 及其制剂的合理使用提供了新的依据。

#### 参考文献

- [1] Spence J D. Controlling resistant hypertension [J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2018, 3(2): 69-75.
- [2] Stenehjem J S, Hjerkind K V, Nilsen T I L. Adiposity, physical activity, and risk of hypertension: prospective data from the population-based HUNT Study, Norway [J]. *J Hum Hypertens*, 2018, 32(4): 278-286.
- [3] Petrie J R, Guzik T J, Touyz R M. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: clinical insights and vascular mechanisms [J]. *Can J Cardiol*, 2018, 34(5): 575-584.
- [4] Simundic T, Jelakovic B, Dzumahur A, et al. Interleukin 17A and toll-like receptor 4 in patients with arterial hypertension [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2017, 42(1): 99-108.
- [5] Hernanz R, Martínez-Revelles S, Palacios R, et al. Toll-like receptor 4 contributes to vascular remodelling and endothelial dysfunction in angiotensin II-induced hypertension [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(12): 3159-3176.
- [6] Chakrawarti L, Agrawal R, Dang S, et al. Therapeutic effects of EGCG: a patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2016, 26(8): 907-916.
- [7] Zhu C, Xu Y, Liu Z H, et al. The anti-hyperuricemic effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on hyperuricemic mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97(1): 168-173.
- [8] 余岳, 葛洁, 曹旭晨. 表没食子儿茶素没食子酸酯抗乳腺癌作用机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2019, 34(8): 2567-2571.
- [9] Han X D, Zhang Y Y, Wang K L, et al. The involvement of Nrf2 in the protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on NaAsO<sub>2</sub>-induced hepatotoxicity [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(39): 65302-65312.
- [10] 刘婷婷, 孟馨. 表没食子儿茶素没食子酸酯抗氧化作用机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2016, 31(6): 919-923.
- [11] Zheng X, Li X, Chen M, et al. The protective role of hawthorn fruit extract against high salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats: impact on oxidative stress and metabolic patterns [J]. *Food Funct*, 2019, 10(2): 849-858.
- [12] Zhou J, Lei Y, Chen J, et al. Potential ameliorative effects of epigallocatechin 3 gallate against testosterone-induced benign prostatic hyperplasia and fibrosis in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 64: 162-169.
- [13] Li H B, Li X, Huo C J, et al. TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B signaling and PPAR- $\gamma$  within the paraventricular nucleus are involved in the effects of telmisartan in hypertension [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, 305(1): 93-102.
- [14] Kleiweietfeld M, Manzel A, Titze J, et al. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 518-522.
- [15] Wan Z, Wen W, Ren K, et al. Involvement of NLRP3 inflammasome in the impacts of sodium and potassium on insulin resistance in normotensive Asians [J]. *Br J Nutr*, 2018, 119(2): 228-237.