

茶多酚对压力超负荷所致大鼠心肌肥厚的影响

武煜¹, 顾振纶¹, 谢梅林¹, 周文轩², 郭次仪²

(1. 苏州大学医学院 药理学教研室、苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 香港保健协会, 香港)

心肌肥厚是心脏对慢性压力或容量超负荷产生的适应性反应, 以心肌细胞蛋白合成增加和细胞体积增大为主要特征, 常见于高血压心脏病、肺动脉高压及慢性充血性心力衰竭等。心肌肥厚中最常见的是左室肥厚, 这是一种极其重要的、独立的心血管危险因素, 可使心肌缺血、心律失常、心力衰竭和猝死的机率增加 6~8 倍。因此, 防治左室肥厚的研究具有重要的临床意义^[1,2]。多种因素参与心肌肥厚的形成, 近年研究结果表明, 能量供应和负荷需求之间平衡关系的失调可能是心肌肥厚发生的重要因素^[3]。茶多酚 (tea polyphenol, TP) 是茶叶中的主要活性成分, 具有抗氧化、抗诱变、神经保护、抑制肿瘤发生和调血脂等作用^[4~6], 但 TP 对心肌肥厚的影响未见文献报道。本实验通过结扎大鼠腹主动脉造成心肌肥厚, 观察 TP 对其的保护作用, 为 TP 预防心肌肥厚提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂: TP, 苏州大学医学院药理教研室、苏州中药研究所提供, 质量分数 90.4%, 临用时用蒸馏水配制; 卡托普利 (Captopril), 常州制药有限公司, 批号 0305009; SOD、MDA、游离脂肪酸 (FFA)、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和羟脯氨酸测定试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供, 批号 030412。

1.2 实验动物: 清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体重 180~220 g, 由苏州大学实验动物中心提供。动物生产许可证号: XCYK (苏) 2002—0008, 动物使用许可证号: SYXK (苏) 2002—037。

1.3 仪器: LENG GUANG721 型紫外分光光度计, 上海第三分析仪器厂; Zs83—1 型匀浆器, 浙西机械厂制造; RBP—1 型大鼠血压计, 中日友好临床研究所提供; 电热恒温水浴箱, 上海医疗器械七厂生产; 80—2 型离心机, 上海手术器械厂生产。

2 方法

2.1 心肌肥厚模型的复制、分组及给药: 采用结扎大鼠腹主动脉的方法造成心肌肥厚模型。大鼠 ip 戊

巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 行腹正中切口, 在肾动脉上方 0.5 cm 处分离腹主动脉, 用 4 号丝线将腹主动脉和 7 号注射器针头一同结扎, 确认扎紧后抽去针头, 造成该部位不完全结扎, 逐层缝合腹部切口。术后每只大鼠 im 青霉素 80 000 U 一周抗感染。假手术组动物开腹后分离腹主动脉但不结扎, 其余步骤同造模组。术后动物均常规饲养。将结扎腹主动脉手术成功大鼠随机分为 5 组: 模型组, TP 300、150、75 mg/kg 组, 阳性对照卡托普利 50 mg/kg 组, 每组 8 只大鼠。术后第 2 天开始 ig 给药, 每日 1 次。模型组及假手术组 ig 等量蒸馏水, 连续给药 35 d。

2.2 血压测量: 采用大鼠尾套法于 9:30~11:00 时测量清醒状态下大鼠收缩压。手术前及术后第 35 天监测各组大鼠血压变化。

2.3 大鼠体重指数测定: 于末次给药 1 h 后测大鼠体重, 麻醉, 腹主动脉取血后迅速开胸取出心脏, 生理盐水洗净, 滤纸吸干后称全心质量, 左心室质量, 计算全心质量/体重和左心室质量/体重值。

2.4 大鼠血清生化指标测定: 大鼠腹主动脉取血, 静置, $1\,700 \times g$ 离心 8 min, 取血清。按试剂盒要求测定各项生化指标。

2.5 心肌组织中 FFA、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 和羟脯氨酸的测定: 取大鼠心尖组织, 用生理盐水在冰浴下制成 10% 心肌组织匀浆, $1\,700 \times g$ 离心 10 min, 弃去沉淀后, 上清液再用生理盐水 (1:4) 稀释成 2% 组织匀浆, 按试剂盒测定说明书测定各指标。蛋白水平以考马斯亮蓝法测定, 以牛血清白蛋白为标准。

2.6 心肌组织光镜检查: 将左心室固定于 10% 福尔马林液中作常规石蜡切片, HE 染色后镜检。

2.7 统计学方法: 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性差异用 Student's *t* 检验。

3 结果

3.1 对大鼠血压的影响: 结果表明, 随饲养时间延长, 假手术组大鼠血压基本平稳, 而模型组大鼠血压

收稿日期: 2004-08-19

基金项目: 香港保健协会研究项目 (H. K200208)

作者简介: 武煜 (1979—), 女, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学。

显著升高,TP 用药组 (300、150、75 mg/kg) 可呈剂量依赖的方式抑制血压上升。阳性药卡托普利 (50 mg/kg) 抑制血压升高更为明显,见表 1。

3.2 对大鼠心重指数的影响:结果显示,与假手术组比较,模型组各心脏质量参数:全心质量、左心室质量、全心质量/体重和左心室质量/体重均增加,差异非常显著 ($P<0.01$)。TP 300 和 150 mg/kg 及阳性药卡托普利 50 mg/kg 可抑制各心脏质量参数的增加,与模型组相比,差异显著或非常显著 ($P<0.05、0.01$),TP 75 mg/kg 组未见有统计学意义,见表 2。

表 1 TP 对心肌肥厚大鼠收缩压的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of TP on systolic blood pressure in myocardial hypertrophy rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	收缩压/kPa		kPa 差值
		给药前	给药 35 d 后	
假手术	—	11.7±1.2	11.9±0.6	-0.0±1.0
模型	—	10.9±1.1	20.6±0.9**	9.6±1.7**
TP	300	11.6±1.6	16.4±1.2△△	4.9±0.9△△
	150	12.1±0.8△	17.8±1.4△△	5.7±1.6△△
	75	12.3±0.9△	20.3±0.8△△	7.9±0.5△△
卡托普利	50	11.5±1.1	13.8±0.9△△	2.2±0.8△△

与假手术组比较: ** $P<0.01$
与模型组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$
** $P<0.01$ vs Sham-operation group
△ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ vs model group

表 2 TP 对心肌肥厚大鼠心重指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of TP on heart weight indices in myocardial hypertrophy rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	全心质量/	左心室质量/	全心质量/体重	左心室质量/体重
		g	g	(mg · g ⁻¹)	(mg · g ⁻¹)
假手术	—	1.12±0.06	0.77±0.05	3.01±0.04	2.07±0.02
模型	—	1.50±0.19**	1.07±0.14**	4.49±0.24**	3.22±0.22**
TP	300	1.15±0.13△△	0.81±0.10△△	3.67±0.27△△	2.57±0.25△△
	150	1.27±0.13△△	0.86±0.09△△	3.88±0.21△△	2.75±0.08△△
	75	1.32±0.09△	0.97±0.08	4.25±0.24	3.13±0.23
卡托普利	50	1.22±0.17△△	0.87±0.09△△	3.44±0.23△△	2.46±0.26△△

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$
** $P<0.01$ vs Sham-operation group; △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ vs model group

表 3 TP 对心肌肥厚大鼠血清 SOD 活性和 MDA 水平及血清和心肌组织中 FFA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of TP on serum SOD activity and MDA level and FFA level in serum and myocardial tissue in myocardial hypertrophy rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组 别	剂量/ (mg · kg ⁻¹)	SOD/	MDA/	FFA	
		(U · mL ⁻¹)	(nmol · mL ⁻¹)	血清/(μmol · L ⁻¹)	心肌组织/(μg · g ⁻¹)
假手术	—	176.98±4.76	5.90±0.34	294.46±22.02	101.24±8.48
模型	—	162.91±2.13**	6.67±0.39**	528.11±16.49**	351.14±42.04**
TP	300	172.29±3.16△△	5.83±0.56△△	328.26±22.65△△	120.98±20.42△△
	150	170.00±4.64△△	5.93±0.52△△	343.48±21.30△△	132.92±12.84△△
	75	167.90±2.69△△	5.96±0.56△	376.09±30.03△△	155.76±17.59△△
卡托普利	50	168.40±3.63△△	5.97±0.96△	390.59±11.56△△	201.16±33.29△△

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$
** $P<0.01$ vs Sham-operation group; △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ vs model group

3.3 对大鼠血清 SOD 和 MDA 的影响:结果表明,造模 35 d 后,大鼠血清 SOD 活性降低,MDA 水平升高,与假手术组相比差异非常显著 ($P<0.01$),给予 TP 35 d 后,大鼠血清 SOD 活性可显著升高,MDA 水平降低,与模型组相比差异显著或非常显著 ($P<0.05、0.01$),见表 3。

3.4 对大鼠血清和心肌组织 FFA 的影响:结果表明,大鼠腹主动脉缩窄 35 d 后,血清及心肌组织中 FFA 水平明显升高,与假手术组相比差异非常显著 ($P<0.01$),给予 TP 35 d 后,大鼠血清及心肌组织中 FFA 水平显著降低,与模型组相比差异非常显著 ($P<0.01$),见表 3。

3.5 对大鼠心肌组织 Na⁺-K⁺-ATPase 活性的影响:结果显示,模型组心肌组织中 Na⁺-K⁺-ATPase 活性显著降低,与假手术组相比差异非常显著 ($P<0.01$),给予 TP 35 d 后,大鼠 Na⁺-K⁺-ATPase 活性升高,尤其是 TP 300 mg/kg 组的作用更为明显,与模型组比较差异非常显著 ($P<0.01$),见表 4。

3.6 对大鼠心肌组织羟脯氨酸的影响:模型组心肌羟脯氨酸水平增加,与假手术组相比差异非常显著 ($P<0.01$),TP 可抑制心肌组织羟脯氨酸水平增加,与模型组相比差异非常显著 ($P<0.01$),见表 4。

表 4 TP 对心肌肥厚大鼠心肌组织 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性和羟脯氨酸水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

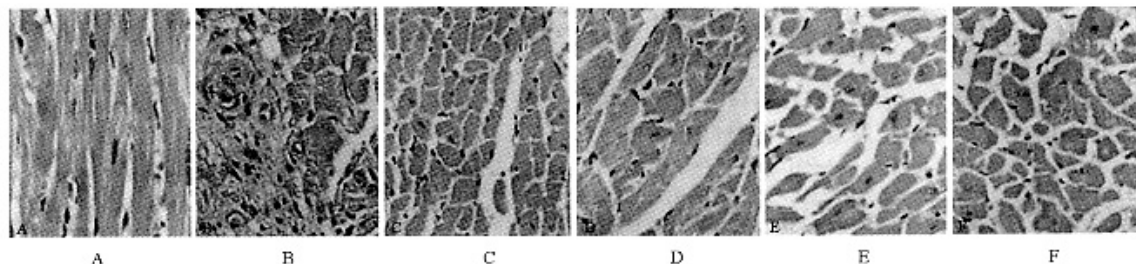
Table 4 Effect of TP on $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ activity and hydroxyproline level in myocardial tissue in myocardial hypertrophy rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	$\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}/$ ($\mu\text{mol Pi} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	羟脯氨酸/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$)
假手术	—	1.71 ± 0.41	0.32 ± 0.02
模型	—	$0.87 \pm 0.18^{**}$	$0.61 \pm 0.05^{**}$
TP	300	$1.41 \pm 0.46^{\Delta\Delta}$	$0.38 \pm 0.04^{\Delta\Delta}$
	150	1.15 ± 0.33	$0.40 \pm 0.02^{\Delta\Delta}$
	75	1.07 ± 0.29	$0.41 \pm 0.03^{\Delta\Delta}$
卡托普利	50	$1.58 \pm 0.33^{\Delta\Delta}$	$0.38 \pm 0.02^{\Delta\Delta}$

与假手术组比较: $^{**}P<0.01$; 与模型组比较: $^{\Delta\Delta}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ vs Sham-operation group;

$^{\Delta\Delta}P<0.01$ vs model group



A-假手术组 B-模型组 C~E-TP 300、150、75 mg/kg 组 F-卡托普利组

A-Sham-operation group B-model group C-E-TP 300、150、75 mg/kg groups F-Captopril group

图 1 TP 对心肌肥厚大鼠心肌病理变化的影响 (HE 染色)

Fig. 1 Effect of TP on myocardial pathological changes in myocardial hypertrophy rats (HE stain)

形成环状螯合物而产生沉淀,从而消除体内过剩的重金属离子,故 TP 可通过络合血管紧张素转换酶 (ACE) 的金属辅基锌离子而抑制 ACE 活性,使产生升压作用的血管紧张素活化过程受阻,从而使血管扩张,血压下降。

腹主动脉狭窄后,心肌 SOD 活性下降,MDA 水平明显升高,提示氧自由基 (OFR) 可能参与了心肌肥厚的发生发展过程。当压力后负荷增加时,室壁张力增加使心肌受损,产生应激,大量 OFR 形成。OFR 可致线粒体结构破坏和功能障碍,抑制 ATP 合成体系中的酶,使 ATP 合成减少,心肌能量缺乏,导致心肌肥厚的发生发展。

实验中观察到,连续 ig TP 可剂量依赖性地增加肥厚心肌 SOD 活性,降低 MDA 水平,表明 TP 具有清除 OFR 作用。TP 具有抗氧化的多种有利条件:TP 含有多酚羟基,可作为供氢体,减少 OFR 产生的可能性;并能夺取过氧化过程中产生的脂质过氧化自由基,生成活性较低的多酚自由基,打断自由基氧化链反应,有效清除体内有害自由基;在中性或酸性条件下,TP 的邻位二酚羟基与金属离子螯合,

3.7 大鼠心肌组织光镜检查:大鼠心肌组织切片 HE 染色后可以看到,正常大鼠心肌胶原纤维排列整齐,细胞核形态大小正常。模型组大鼠的心肌胶原纤维走向紊乱,细胞间质纤维化增多,心肌纤维可见溶解断裂,细胞核明显肥大。TP 300、150 mg/kg 组心肌胶原排列趋于正常,心肌细胞未见明显异常,细胞核肥大减轻,而 TP 75 mg/kg 组在形态学上未见有明显改善,见图 1。

4 讨论

本实验采用结扎大鼠腹主动脉造成高负荷,导致心肌向心性肥厚。连续 ig TP 35 d 可明显抑制大鼠血压升高,其作用机制可能是由于 TP 分子内有多数个邻位酚羟基,可作为配体与一个中心离子络合,

阻止金属离子对 OFR 生成和链反应的催化作用,起到抗脂质过氧化功效。

在压力超负荷诱发心肌肥厚时,心脏更多的以葡萄糖作为主要的能量来源,与胚胎能量代谢程序相一致,而降低了脂肪酸氧化,造成循环中 FFA 明显升高,心肌对 FFA 摄取能力下降。脂肪酸氧化减弱造成长链乙酰 CoA 及长链乙酰肉毒碱等有害中间产物堆积,这些物质存在亲水及亲脂基因,可破坏细胞膜、线粒体膜,加重心脏受损^[7]。本实验中,TP 可有效降低血清及心肌组织中的 FFA,提示 TP 可能从抑制脂肪酸代谢,抑制 FFA 氧化,促进糖氧化,减少 H^+ 产生,减少细胞酸中毒等方面改善能量代谢,阻止 FFA 对心肌的损伤,从而阻心肌肥厚的发生发展。

本实验还观察到压力超负荷所致大鼠心肌肥厚, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活力显著下降。细胞膜上的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 对于维持细胞内的正常离子浓度,以及细胞的能量产生和利用有重要意义。压力超负荷形成心肌肥厚时,肥大的心肌细胞使心肌耗氧量增加,导致心肌处于相对缺血缺氧状态,继而使

$\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性相对降低及其活性受到抑制。 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性下降会引起胞内 Na^+ 超负荷,激活心肌膜上的 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换蛋白,使 Ca^{2+} 进入胞内增加,最终造成钙超载,加重心肌肥厚的损伤,形成恶性循环。而且, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性降低可使胞外 K^+ 浓度升高,增加诱发心律失常的危险性^[8,9]。TP 及阳性药卡托普利均可增加 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 的活力,这也可能是其抑制心肌肥厚发生发展的一个方面。

羟脯氨酸占胶原中总氨基酸的 13.4%,可以代表胶原的水平。心肌肥厚的发生过程中,心肌羟脯氨酸水平升高,心肌细胞表型变化,体积增大,心肌细胞内收缩蛋白的类型改变,心肌间质细胞增殖,纤维组织增生,产生大量的胶原和纤维素,使心肌结构紊乱^[10,11]。本实验结果表明,大鼠主动脉缩窄 35 d 后,羟脯氨酸水平显著升高,另从病理镜检可观察到模型组大鼠心肌胶原纤维走向紊乱,间质纤维增多,细胞核肥大。TP 可使心肌羟脯氨酸水平下降,并从形态学上改善心肌间质纤维化,减轻心肌细胞核肥大。提示 TP 具有抑制间质细胞胶原增加,改善心肌重构的功效。其机制可能与抑制 OFR 生成,络合 ACE 及稳定 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 有关。

本实验提示,TP 可有效抑制压力超负荷引起的大鼠左心室肥厚,抑制血压升高,保护心肌的结构和功能,恢复 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性及改善心肌能量代谢,其作用可能与清除 OFR 及调控 FFA 代谢

有关,但其确切的分子作用机制有待于进一步研究。

References:

- [1] Bruckner B A, Razeghi P. Degree of cardiac fibrosis and hypertrophy at time of implantation predicts myocardial improvement during left ventricular assist device support [J]. *J Heart Lung Trans*, 2004, 23(1): 36-42.
- [2] Tarone G, Lembo G. Molecular interplay between mechanical and human signaling in cardiac hypertrophy [J]. *Trends Mol Med*, 2003, 9(9): 376-382.
- [3] Finck D N, Kelly D P. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) signaling in the gene regulatory control of energy metabolism in the normal and diseased heart [J]. *J Mol Cell Cardiac*, 2002, 34(10): 1249-1257.
- [4] Yan T X, Zhang W G. Studies on the progression of tea polyphenol prevent cardiac and cerebral vascular disease [J]. *J Shandong Univ Tradit Chin Med* (山东中医药大学学报), 2000, 24(4): 314-316.
- [5] Lee S R, Im K J, Suh S I, et al. Protective effect of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and other anti oxidants on lipid peroxidation ingerbil brain homogenates [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(3): 206-209.
- [6] Hong L J, Ping Y, Zhao B L. Protective effects of green tea polyphenols on human HepG2 cells against oxidative damage of fenofibrate [J]. *Free Radical Biol Med*, 2003, 35(19): 1121-1128.
- [7] Lehman J J, Kelly D P. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2002, 29(4): 339-345.
- [8] Verdonck F, Volders P G, Vos Marc A, et al. Intracellular Na^+ and altered Na^+ transport mechanisms in cardiac hypertrophy and failure [J]. *J Mol Cell Cardiac*, 2003, 35(1): 5-25.
- [9] Sheng X C, Qian Z Y. Effect of crocetin on ATPase and hydroxyproline in myocardial hypertrophy rat induced by overload pressure [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(6): 534-537.
- [10] Zhang H Y, Wei Z D. Progress in the remodeling of cardiac collagen Net-work [J]. *Adv Cardiol Dis* (心血管病学进展), 2003, 24(5): 359-362.
- [11] Taniyama Y, Morishita R. Potential contribution of a novel antifibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamster [J]. *Am J Cardiol*, 2000, 85(10): 1207.

第九届全国中药和天然药物学术研讨会、第五届全国药用植物学及植物药学术研讨会

第九届全国中药和天然药物学术研讨会、第五届全国药用植物学及植物药学术研讨会定于 2005 年 10 月 12—15 日在湖北省武汉市举行。

本次会议将由中国药学会中药和天然药物专业委员会、中国植物学会药用植物学及植物药专业委员会共同主办,由中国药学会湖北分会、中国植物学会湖北分会、华中科技大学同济医学院和中国科学院武汉植物园共同承办。此次学术会议是一次涉及植物药、中药和天然药物的多学科性大会,会议将邀请院士和知名专家学者参加并作学术报告。

我们热情邀请各位同仁、同学和企业代表参加本届大会,您将会了解到国内中药、植物药和天然药物研究的最新动态,有机会与国内知名科学家交流探讨该研究领域的热点问题。我们希望从事中药学、天然药物化学、植物学、植物药等领域研究的专家学者和同学踊跃投稿、参会,以推动中国中药、植物药和天然药物研究不断向前发展。

摘要及论文截止日期:摘要:2005 年 7 月 1 日;论文:2005 年 8 月 25 日

征文内容:1. 中药、植物药资源的开发利用和可持续发展;2. 天然药物生物活性物质及作用机制的研究;3. 中药新剂型及关键技术的研究;4. 中药现代分析及质量标准的研究;5. 中药鉴定新技术及分子生物学研究;6. 濒危药用植物及中药材 GAP 的研究;7. 民族植物药的研究等;8. 中医药研究与西部开发。

联系人:阮汉利 (Tel: 13339986848; E-mail: ruanhl@mails.tjmu.edu.cn)

张勇慧 (Tel: 13397120618; E-mail: zhangyh@mails.tjmu.edu.cn)

吴继洲 (Tel: 13808665718; E-mail: ywz@mails.tjmu.edu.cn)

通讯地址:华中科技大学同济医学院药学院 430030

传真:(027) 83692739