

· 论 著 ·

表没食子儿茶素没食子酸酯对高糖促血管平滑肌细胞增殖的抑制效应*

韩 愈¹, 杨 剑^{1,2△}, 孙海岚², 陈彩宇¹, 何多芬¹, 蒋宝泉², 周 林¹, 曾春雨¹

(第三军医大学大坪医院:1. 心血管内科;2. 营养科, 重庆 400042)

摘 要:目的 研究表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对高糖诱导的血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖的抑制效应及其作用机制。方法 以大鼠胸主动脉平滑肌细胞株(A10 细胞)为研究对象,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)和细胞计数方法测定细胞增殖状况,免疫印迹检测 EGCG 对高糖促增殖中的 1-磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/AKT 信号途径的影响。结果 不同浓度高糖(15、30、50 mmol/L)可以促进 A10 细胞增殖;50 μ mol/L EGCG 对 A10 细胞具有一定的抑制增殖作用;EGCG(50 μ mol/L)与高糖(30 mmol/L)共作用 A10 细胞后,可明显抑制高糖促 VSMCs 增殖作用;EGCG(50 μ mol/L)能够降低高糖(30 mmol/L)对 PI3K/AKT 信号的激活效果。结论 EGCG 对高糖促 VSMCs 增殖具有明显抑制效应,该作用可能与 PI3K/AKT 信号途径有关。

关键词:没食子酸;葡萄糖溶液,高渗;肌,平滑,血管;细胞增殖;1-磷脂酰肌醇 3-激酶

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.34.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)34-3433-03

Inhibitory effects of epigallocatechin gallate on high glucose-induced proliferation of vascular smooth muscle cells*

Han Yu¹, Yang Jian^{1,2△}, Sun Hailan², Chen Caiyu¹, He Duofen¹, Jiang Baoquan², Zhou Lin¹, Zeng Chunyu¹

(1. Department of Cardiovascular Medicine; 2. Department of Nutrition, Daping Hospital, Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on high glucose-induced proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) and its mechanism. **Methods** Rat thoracic aorta VSMCs (A10 cells) served as research object. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and cell counting were used to determine cellular proliferation. Immunoblotting was applied to determine the effects of EGCG on 1-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT signaling pathway in A10 cell proliferation induced by high glucose. **Results** Different concentration of high glucose (15 mmol/L, 30 mmol/L and 50 mmol/L) could induce proliferation of A10 cells, 50 μ mol/L EGCG possessed some inhibitory effects on proliferation of A10 cells. EGCG (50 μ mol/L) and high glucose (30 mmol/L) co-treatment could significantly inhibit high glucose-induced VSMCs proliferation, and EGCG (50 μ mol/L) could lessen the effects of high glucose on activation of PI3K/AKT signaling. **Conclusion** EGCG exerts significant inhibitory effects on high glucose-induced VSMCs proliferation, which may be related to PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: gallic acid; glucose solution, hypertonic; muscle, smooth, vascular; cell proliferation; 1-phosphatidylinositol 3-kinase

在糖尿病(DM)性血管病变中,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)异常增殖是引起动脉粥样硬化(AS)的重要因素。研究表明,高糖通过促进 VSMCs 增殖在血管病变的发生、发展中扮演重要角色^[1-2]。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)为绿茶中的主要活性成分,具有抗肿瘤、抗炎等多种生物学效应,对包括 DM 在内的多种疾病均有明显的药理作用^[3-4]。但是,EGCG 能否有效抑制高糖引起的 VSMCs 增殖并不清楚。本研究以大鼠胸主动脉平滑肌细胞株(A10 细胞)为研究对象,观察 EGCG 对高糖环境下 VSMCs 增殖的抑制效应并初步探讨其作用机制,探索 EGCG 保护 DM 心血管病变的作用机制。

1 材料与方

1.1 材料 DMEM 干粉培养基购自美国 HyClone 公司;EGCG 购自 Sigma 公司;Akt、p-Akt、1-磷脂酰肌醇 3-激酶(1-phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、p-PI3K 等一抗均为羊抗多克隆抗体,购自美国 Cell Signaling 公司;四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购自北京中衫公司;SuperSignal 发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 A10 细胞株在含有 95% 空气和 5% CO₂

的培养箱培养,所用培养基为 10% 胎牛血清、5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液。

1.2.2 MTT 实验 将 A10 细胞株制成单细胞悬液,计数后将细胞浓度调整为 1×10^4 /mL,接种于 96 孔培养板培养 48 h,细胞融合 80%~90%时更换 0.1% 胎牛血清培养液培养 4 h,加入葡萄糖和(或)EGCG 继续培养 24 h,然后每个孔加入 5 mg/mL 的 MTT 液 20 μ L,置培养箱中继续培养 4 h,观察细胞生长情况,吸弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μ L,振荡器上摇匀 10 min,在吸收波长 490 nm 条件下测值。

1.2.3 细胞计数 按实验分为对照组、高糖组(15 mmol/L 组、30 mmol/L 组、50 mmol/L 组)、EGCG 组、HG+EGCG 组(高糖 30 mmol/L+EGCG 50 μ mol/L),加入不同的干预药物培养 24 h 后,吸弃上清液,每孔加入 0.25% 胰酶消化细胞,消化的细胞悬液 0.1 mL 加 0.9 mL 无血清 DMEM 培养基,混匀后滴入细胞计数板内,于低倍镜下计数 4 角的 4 个大方格内的细胞总数,用下列公式计数:细胞浓度 = 4 个大方格内细胞总数 / $4 \times 10^4 \times$ 稀释倍数(10) = 细胞数/mL。

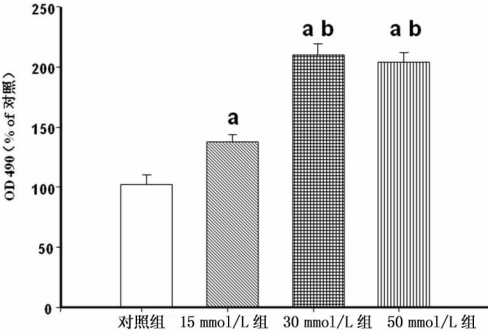
1.2.4 免疫印迹观察 A10 细胞中 Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K 表达 药物干预后的细胞经过常规方法提取蛋白,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干转移法将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,5%

脱脂奶粉封闭过夜,与 Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K 抗体(稀释度为 1 : 1 000)作用 1 h 后,TBST 液洗涤 3 次,羊抗兔 IgG (稀释度为 1 : 5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后,采用 Super-Signal 显色发光。

1.3 统计学处理 采用 SigmaPlot11.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间采用 *t* 检验,两组以上的比较采用 ANOVA 法进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

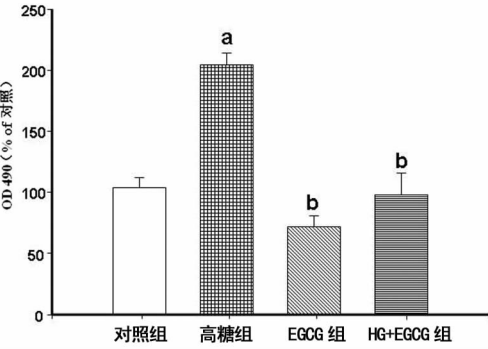
2.1 高糖对 A10 细胞增殖的影响 不同葡萄糖浓度的培养基(15 mmol/L、30 mmol/L、50 mmol/L)对 A10 细胞进行培养,结果显示高糖对 A10 细胞具有明显的促增殖效应(图 1)。其中,30 mmol/L 与 50 mmol/L 葡萄糖对 VSMCs 的促增殖效应均明显高于 15 mmol/L 葡萄糖效应,但是 30 mmol/L 与 50 mmol/L 浓度之间没有显著区别。



^a: $P < 0.05$,与对照比较;^b: $P < 0.05$,与 15mmol/L 比较; $n = 6$ 。

图 1 不同浓度高糖对 A10 细胞增殖的影响

2.2 EGCG 对高糖促 VSMCs 增殖作用的抑制效应 利用 EGCG(50 μ mol/L)作用 A10 细胞后,发现 50 μ mol/L EGCG 对 VSMCs 增殖具有一定的抑制作用;但是,EGCG(50 μ mol/L)与高糖(30 mmol/L)共作用 VSMCs 后,能够更为显著地抑制高糖对 VSMCs 的促增殖效应(图 2),明显高于单独 EGCG(50 μ mol/L)对 A10 增殖的抑制强度。



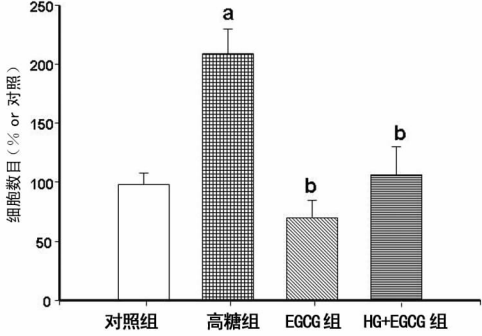
^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与高糖组比较; $n = 4$ 。

图 2 EGCG 对高糖促 VSMCs 增殖作用的抑制效应

2.3 细胞计数验证 EGCG 抑制高糖促 VSMCs 增殖的效应 利用细胞计数方法观察在高糖与 EGCG 作用时,发现 VSMCs 数量的变化情况为:高糖(30 mmol/L)可以促进 A10 细胞的生长,增加 A10 细胞的数量;利用 EGCG(50 μ mol/L)与高糖共作用于 A10 细胞后,能够有效抑制高糖促 A10 细胞生长增殖效应(图 3)。

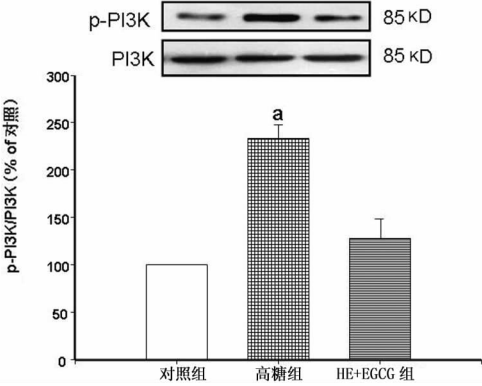
2.4 EGCG 通过对 PI3K/AKT 途径的作用抑制高糖促 A10 细胞增殖 通过观察 EGCG 对 PI3K/AKT 信号途径的影响,

结果发现,高糖(30 mmol/L)作用 10 min 后,可以增强磷酸化 PI3K 与 AKT 的表达水平,对总的 PI3K 与 AKT 表达并无影响;EGCG(50 μ mol/L)与高糖(30 mmol/L)共作用 A10 细胞后,EGCG 能够有效降低高糖(30 mmol/L)对磷酸化 PI3K 与 AKT 表达的增强效果(图 4、5)。



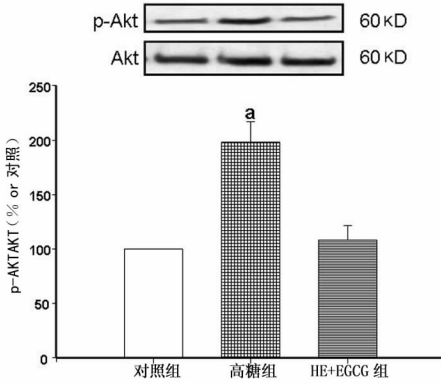
^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与高糖组比较; $n = 7$ 。

图 3 EGCG 抑制高糖促 A10 细胞生长作用的影响



^a: $P < 0.05$,与对照组比较; $n = 3$ 。

图 4 EGCG 对高糖诱导 p-PI3K 表达的抑制效应



^a: $P < 0.05$,与对照组比较; $n = 4$ 。

图 5 EGCG 对高糖诱导 p-Akt 表达的抑制效应

3 讨 论

大血管病变是 DM 患者严重并发症之一,也是 DM 患者致残、致死的主要原因。AS 是 DM 大血管病变的主要病理基础。慢性持续的高血糖是 DM 患者易发生 AS 的主要原因之一,血糖增高介导的多种病理过程在 DM 血管并发症的发病中起重要作用。VSMCs 作为血管壁的主要构成成分,在 DM 血管损伤的发病机制中占有重要地位。在高糖环境的刺激下,VSMCs 过度增殖和凋亡受阻等是 AS 发生的重要因素。在本研究中,利用不同葡萄糖浓度的培养基(15 mmol/L、30 mmol/L

L, 50 mmol/L) 对血管平滑肌 A10 细胞进行培养, 发现高糖能够明显促进 A10 细胞生长和增殖, 这与以往的研究结果较为一致^[5]。

近年来, 绿茶主要活性成分 EGCG 由于其分子结构明确、无明显毒副作用, 作用环节较多等优点, 在对 DM 等慢性疾病的防治中越来越受到关注^[6-7]。EGCG 是绿茶中含量最高的一种儿茶素, 其抗氧化能力最强, 多个实验在细胞与动物模型中已经报道了 EGCG 对 DM 及其靶器官损伤具有保护作用。EGCG 能够通过抗氧化效应与抗凋亡作用直接保护胰腺 β 细胞^[8]; EGCG 可有效改善大鼠肝癌细胞中葡萄糖和脂类代谢状况, 显著提高 DM 啮齿类动物的葡萄糖耐量^[9]; 对链脲霉素诱导的 DM 大鼠模型给予 EGCG 喂养 8 周, 发现 EGCG 可有效降低其血糖水平, 减轻肝脏的脂质过氧化作用等^[10]; 同时, 对 DM 大鼠进行长期 EGCG 作用后, 能够通过 NO 与前列腺素依赖途径改善 DM 大鼠的血管反应性, 降低主动脉脂质过氧化反应^[11]。本研究发现, 单独 EGCG 对 VSMCs 增殖具有一定抑制效应。但是, EGCG 与高糖共同作用后, 能够更为明显地抑制高糖对 VSMCs 的促增殖效应, 且该抑制作用明显高于单独 EGCG 的抑制强度。这提示 EGCG 对高糖引起的 DM 性血管病变具有一定保护作用。

PI3K/Akt 途径在高糖诱导的多种生物学效应发挥了重要作用, 如高糖通过 PI3K/Akt 途径诱导内皮细胞凋亡^[12]; 高糖在肾小球膜细胞中通过 PI3K/Akt 信号诱导了胶原 I 产生, 与 DM 性肾病变密切相关^[13]。同时, 研究报道多种因素均能够针对 PI3K/Akt 途径有效抑制高糖的不利作用。L-精氨酸能够通过 PI3K/Akt 途径抑制高糖对内皮细胞的诱导衰老效应^[14]; 罗格列酮通过 PI3K/Akt 途径有效抑制高糖诱导的内皮细胞凋亡^[15]; 白藜芦醇在小鼠心脏成纤维细胞中通过抑制高糖诱导的 PI3K/Akt 途径, 抑制 IL-17 表达^[16]。本研究发现单独高糖 (30 mmol/L) 作用能够增强磷酸化 PI3K 与 AKT 的表达水平。但是, EGCG (50 μ mol/L) 与高糖共作用 A10 细胞后, EGCG 能够有效降低高糖对磷酸化 PI3K 与 AKT 表达的增强效果, 进而阻断高糖对 PI3K 与 AKT 信号途径的激活效应, 提示 EGCG 通过对 PI3K/AKT 途径的阻断作用, 从而抑制高糖促 A10 细胞增殖作用。

综上所述, EGCG 能够有效抑制高糖对 VSMCs 的促增殖效应, 该抑制效应与 PI3K/Akt 信号途径密切相关。这提示绿茶主要活性成分 EGCG 对 DM 性血管病变具有保护作用, 在一定程度上能够减轻高糖对血管的损伤, 抑制 DM 血管并发症的发展过程。

参考文献:

- [1] Karastergiou K, Kaski JC. Medical management of the diabetic patient with coronary artery disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(25): 2527-2536.
- [2] Srivastava AK. High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells; a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9(1): 85-89.
- [3] Oh CJ, Yang ES, Shin SW, et al. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, regulates high glucose-induced apoptosis [J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(1): 34-40.
- [4] Yamabe N, Yokozawa T, Oya T, et al. Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in

- diabetic nephropathy model rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319(1): 228-236.
- [5] Lee YJ, Kim JS, Kang DG, et al. Buddleja officinalis suppresses high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation: role of mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kappaB and matrix metalloproteinases [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, 235(2): 247-255.
- [6] Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, et al. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(5): 1378-1387.
- [7] Wolfram S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health [J]. *J Am Coll Nutr*, 2007, 26(4): 373-388.
- [8] Hara Y, Fujino M, Takeuchi M, et al. Green-tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate provides resistance to apoptosis in isolated islets [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2007, 14(5): 493-497.
- [9] Wolfram S, Raederstorff D, Preller M, et al. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents [J]. *J Nutr*, 2006, 136(10): 2512-2518.
- [10] Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats [J]. *Pathophysiology*, 2010, 17(1): 55-59.
- [11] Roghani M, Baluchnejadmojarad T. Chronic epigallocatechin-gallate improves aortic reactivity of diabetic rats; underlying mechanisms [J]. *Vascul Pharmacol*, 2009, 51(2/3): 84-89.
- [12] Sheu ML, Ho FM, Yang RS, et al. High glucose induces human endothelial cell apoptosis through a phosphoinositide 3-kinase-regulated cyclooxygenase-2 pathway [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(3): 539-545.
- [13] Wu D, Peng F, Zhang B, et al. Collagen I induction by high glucose levels is mediated by epidermal growth factor receptor and phosphoinositide 3-kinase/Akt signalling in mesangial cells [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(9): 2008-2018.
- [14] Zhong W, Zou G, Gu J, et al. L-arginine attenuates high glucose-accelerated senescence in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 89(1): 38-45.
- [15] Wu J, Lei MX, Xie XY, et al. Rosiglitazone inhibits high glucose-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells through the PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87(7): 549-555.
- [16] Venkatachalam K, Mummidi S, Cortez DM, et al. Resveratrol inhibits high glucose-induced PI3K/Akt/ERK-dependent interleukin-17 expression in primary mouse cardiac fibroblasts [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 294(5): 2078-2087.