

· 基础研究 ·

茶多酚干预缺氧诱导的大鼠肺高血压的实验研究*

欧婷¹, 黄琛², 王利兵¹, 黄美慧¹, 徐戈^{1△}

(1. 广西医科大学附属第一医院心内科, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学第一附属医院干部保健科, 南宁 530021)

摘要:目的 探讨茶多酚(TP)对缺氧诱导的大鼠肺高血压(PH)的作用及可能机制。方法 24只SD大鼠随机均分为正常对照组(C)、缺氧组(H)和TP组。缺氧前TP组大鼠予TP灌胃($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$),C和H组大鼠接受等体积生理盐水灌胃,随后TP和H组大鼠置于常压间断缺氧舱(8 h/d,6天/周)4周。4周后比较各组的右心室收缩压(RVSP)、平均肺动脉压(mPAP)、右心室肥厚指数(RVHI)及肺小动脉管壁厚度,比较肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)凋亡及肺组织 XIAP mRNA 表达水平。结果 H组大鼠的RVSP、mPAP、RVHI、肺小动脉管壁厚度均比C组显著升高($P<0.01$),且PASMCs凋亡明显减少($P<0.01$),肺组织 XIAP mRNA 表达显著升高($P<0.01$)。与H组相比,TP组RVSP、mPAP及RVHI均明显降低,肺小动脉管壁增厚程度减轻,而PASMCs凋亡增加($P<0.05$),肺组织 XIAP mRNA 表达降低($P<0.05$)。结论 TP可改善缺氧诱导的大鼠PH,其机制可能与抑制肺组织 XIAP mRNA 表达水平促进PASMCs凋亡有关。

关键词:高血压,肺性;细胞凋亡;X相关凋亡抑制蛋白;茶多酚

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.19.022

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)19-2243-03

Experimental study of tea polyphenols on hypoxia induced pulmonary hypertension in rats*

Ou Ting¹, Huang Chen², Wang Libing¹, Huang Meihui¹, Xu Ge^{1△}

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China; 2. Department of Cadres Health, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of tea polyphenols(TP) on hypoxia induced pulmonary hypertension(PH) in rats. Methods Twenty-four SD rats were randomly divided into three groups: normal control group(C), hypoxia group(H) and TP group. Before the hypoxia state, The TP group were given TP($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), The C and H groups were given normal saline at the same dosage, then TP group kept in atmospheric pressure with intermittent hypoxia together with the H group(8 h/d,6 d/w) in 4 weeks. After 4 weeks, RVSP, mPAP, RVHI, wall thickness of small pulmonary artery were compared. Apoptosis of PASMCs and the mRNA expression of XIAP were also detected. Results Compared with C group, there were rise in RVSP, mPAP, RVHI, wall thickness of small pulmonary artery in H group($P<0.01$), decrease in PASMCs muscle cell apoptosis($P<0.01$) and increase in XIAP mRNA expression($P<0.01$). There were decrease in RVSP, mPAP, RVHI, wall thickness of small pulmonary artery in TP group compare with H group, increase in PASMCs apoptosis($P<0.05$) and reduction in XIAP mRNA expression($P<0.05$) in TP group. Conclusion TP ameliorate hypoxia induced pulmonary hypertension in rats, its mechanism may be related to inhibit XIAP mRNA expression level then promote the apoptosis of PASMCs.

Key words: hypertension, pulmonary; apoptosis; X-linked inhibitor of apoptosis protein; tea polyphenols

肺高血压(pulmonary hypertension, PH)是一种复杂的致死性综合征,以出现细胞增殖和细胞凋亡失衡的致病性肺血管重塑为特征^[1-2]。多数情况下,细胞凋亡的发生依赖于半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族,而X相关凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)是唯一一个在细胞凋亡起始和执行阶段都能有效抑制caspase酶原活性的凋亡抑制蛋白^[3],但其是否参与PH的发生发展过程尚未明确。

茶多酚(tea polyphenols, TP)是茶叶中多酚类物质的总称,具有抑制细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[4],因此可能成为防治PH的潜在药物。本实验研究中,作者以缺氧性PH大鼠模型为基础,探讨XIAP在PH形成过程中的作用,初步研究TP能否防治缺氧诱导的大鼠PH及其可能机制。

1 材料与方

1.1 材料与试剂 健康雄性SD大鼠24只,体质量280~350g(广西医科大学实验动物中心),TP(西安润堡生物科技有限公司),Trizol试剂盒(Invitrogen公司),逆转录试剂盒(Fermentas公司),Dream Taq green PCR master Mix(2×)(Fer-

mentas公司),TUNEL凋亡试剂盒(Roche公司),CY-12C测氧仪(建德市梅城电化分析仪器厂),MP100A多导生理仪(Santa, Barbara, California),DMR+Q550病理图像分析仪(德国Leica公司),PTC200型PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 动物模型构建及TP干预 24只健康雄性SD大鼠随机分为3组:正常对照组(C),缺氧组(H),茶多酚组(TP),每组8只。缺氧前,TP组给予茶多酚溶液($200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)^[5]灌胃,C和H组大鼠给予等体积生理盐水灌胃,然后H和TP组置于常压缺氧[O_2 浓度为(10 ± 0.5)%]舱内间断缺氧(8 h/d,6天/周)4周。测氧仪监测低氧舱内氧浓度。用碱石灰和无水氯化钙吸收舱内 CO_2 和 H_2O 。C组置于同一房间内正常饲养。

1.3 血流动力学检测 缺氧4周后,3组大鼠经10%水合氯醛腹腔注射麻醉后,用右心导管法行血流动力学检测,自右颈外静脉插入微导管,通过压力传感器接上MP100A多导生理仪,根据生理记录仪显示的压力波形曲线和压力值判断导管口所处位置,固定导管位置,波形稳定后测定大鼠右心室收缩压

(RVSP)和肺动脉压(PAP)并计算平均肺动脉压(mPAP)。

1.4 右心室肥厚指数(RVHI)测定 测压完毕后处死动物,立即游离心脏,生理盐水洗净后剪去心房及大血管根部,将心脏分离为右心室室壁(RV)和左心室+室间隔(LV+S),置于干净滤纸晾干 10 min 后用电子天平分别称取 RV 和 (LV+S),计算 $RVHI=RV/(LV+S)$,判断右心室的肥厚程度。

1.5 肺小动脉形态学观察 肺组织洗净后以 10% 中性甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋切片,厚度 4 μm ,进行 HE 染色。每只大鼠随机选取 3 张左下肺组织切片,每张切片随机选取横截面积较圆直径约 100~200 μm 的细小动脉 5 支,用 Leica Qwin 图像分析仪测定肺小动脉管壁厚度占动脉外径百分比(WT%)及管壁面积占血管总面积的百分比(WA%),判断肺小动脉重塑程度。

1.6 原位缺口末端标记法(TUNEL)检测肺动脉平滑肌细胞凋亡 按 TUNEL 试剂盒说明进行操作。细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞。用 Leica Qwin 图像软件测量每只大鼠 5 条肺小动脉并计数每个肺动脉平滑肌凋亡细胞数(S)和平滑肌细胞数(N),计算肺动脉平滑肌细胞凋亡数与平滑肌细胞数目比值即凋亡指数(S/N)。

1.7 半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肺组织 XIAP mRNA 表达 取大鼠新鲜肺组织约 100 mg,按 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。经逆转录后合成 cDNA 进行 PCR。根据 NCBI 上大鼠 XIAP mRNA 基因序列,采用 Oligo16.0 软件设计 XIAP 基因引物,上游 5'-AGA CAC CAA TAA GGA TGA AGA AT-3',下游 5'-TCC ATA CTG CCA TCT ATC TAC-3'(141 bp)。大鼠内参照(beta-actin)引物上游 5'-CCC ATC TAT GAG GGT TAC GC-3',下游 5'-TTT AAT GTC

ACG CAC GAT TTC-3'(150 bp)。PCR 反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 17 s,共 38 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min 终止反应。将内参和 XIAP 的 PCR 产物在 2.0% 琼脂糖凝胶同时进行电泳,核酸 I 型染料染色,Image Lab 成像系统扫描定量并拍照,用目的条带平均荧光强度与内参 beta-actin 的比值代表其 mRNA 的相对表达水平。

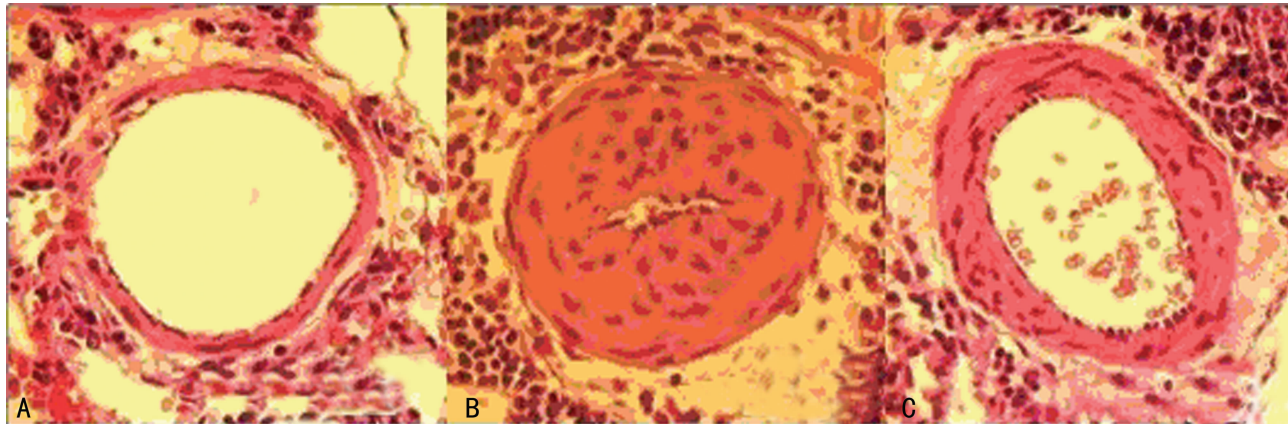
1.8 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多样本均数比较采用方差分析,两样本均数比较采用 *t* 检验。以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RVSP、mPAP 及 RVHI 变化 与 C 组相比,H 组的 RVSP、mPAP 及 RVHI 均明显升高(均 $P<0.01$);TP 组的 RVSP、mPAP 及 RVHI 均明显低于 H 组,见表 1。

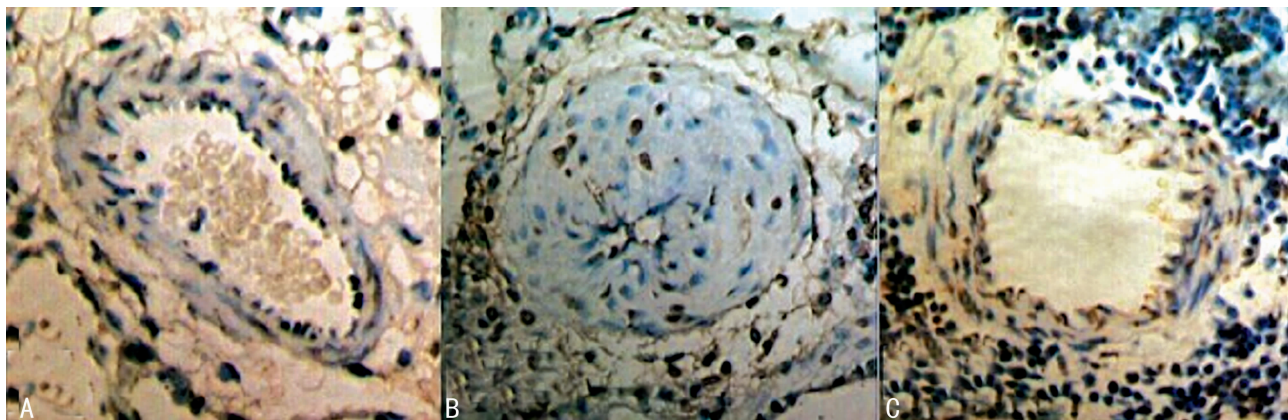
2.2 肺小动脉形态学及图像分析 肺小动脉图像分析结果显示,与 C 组相比,H 组大鼠肺小动脉管壁增厚,管腔严重狭窄,中膜细胞核数密度增加。与 H 组相比,TP 组大鼠肺小动脉管壁明显变薄,管腔显著增大。H 组肺小动脉 WT% 和 WA% 均明显高于 C 组(均 $P<0.01$),而 TP 组 WT%、WA% 较 H 组均显著降低(均 $P<0.01$),见表 1、图 1。

2.3 TUNEL 检测 PSMCs 凋亡 TUNEL 染色切片在光镜下可见细胞核为棕黄色的细胞即凋亡细胞分布于肺小动脉。与 C 组大鼠肺小动脉相比,H 组 PSMCs 中的棕黄色凋亡细胞密度明显减小。而与 H 组相比,TP 组 PSMCs 的棕黄色凋亡细胞密度则明显增加。与 C 组相比,H 组 PSMCs 的 S/N 显著降低[H 组(0.23 \pm 0.03)比 C 组(0.34 \pm 0.03), $P<0.01$]。而与 H 组相比,TP 组 PSMCs S/N 升高[TP 组(0.26 \pm 0.02)比 H 组(0.23 \pm 0.03), $P<0.05$],见图 2。



A: C 组; B: H 组; C: TP 组。

图 1 各组大鼠肺小动脉组织学改变(HE \times 400)



A: C 组; B: H 组; C: TP 组。

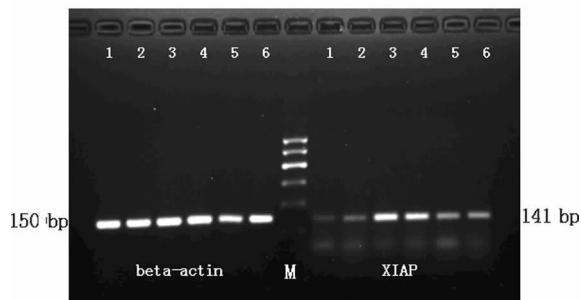
图 2 各组大鼠血管平滑肌细胞凋亡(TUNEL \times 400)

表 1 大鼠各指标比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	RVSP(mm Hg)	mPAP(mm Hg)	RVHI	WT%	WA%
C 组	15.13±2.90	15.13±1.96	0.26±0.03	0.25±0.04	0.36±0.07
H 组	28.88±8.34 ^a	25.50±3.02 ^a	0.38±0.05 ^a	0.63±0.03 ^a	0.71±0.04 ^a
TP 组	21.25±5.06 ^{bd}	20.50±0.93 ^{ac}	0.31±0.03 ^{ad}	0.47±0.07 ^{ac}	0.49±0.03 ^{ac}

^b: $P < 0.05$, ^a: $P < 0.01$, 与 C 组相比; ^d: $P < 0.05$, ^c: $P < 0.01$, 与 H 组相比。

2.4 XIAP mRNA 相对表达量变化 RT-PCR 结果显示, 与 C 组相比, H 组 XIAP mRNA 的相对表达量显著升高 [H 组 (1.26 ± 0.20) 比 C 组 (0.72 ± 0.07), $P < 0.01$]。而 TP 组 XIAP mRNA 的相对表达量则明显低于 H 组 [TP 组 (1.02 ± 0.24) 比 H 组 (1.26 ± 0.20), $P < 0.05$], 见图 3。



M: 标记物; 1, 2: C 组; 3, 4: H 组; 5, 6: TP 组。

图 3 3 组大鼠肺组织 XIAP mRNA 表达

3 讨 论

PH 是在一系列肺血管结构及功能改变的基础上发生血流动力学异常而导致的临床综合征。本研究中大鼠在常压缺氧舱内饲养 4 周后, RVSP、mPAP 及 RVHI 均升高, 肺小动脉形态学观察发现肺小动脉管壁显著增厚、管腔狭窄, 肺小动脉重塑, 表明构建缺氧性肺高血压大鼠模型成功。

XIAP 是凋亡抑制蛋白家族中的成员之一, 参与如受体介导细胞内信号启动和转导等许多功能的调节, 但其最重要的功能是抑制内源性 caspase 的酶原活性^[6]。XIAP 的多重功能源于它的分子结构基础, 其含有 3 个杆状病毒 IAP 重复序列 (BIR1-3) 空间结构域, 可通过 BIR3 结构域选择性抑制凋亡途径的启动因子 caspase-9, 还可通过 BIR2 结构域及 BIR2 前的链接区结合并抑制凋亡执行因子 caspase-3 活性部位从而抑制细胞凋亡途径^[7]。此外, XIAP 还包含一个具有连接酶 E3 介导的自身或靶向蛋白质泛素化降解作用的 RING 结构域^[8]。因此, XIAP 可通过此 RING 结构域特异性靶向结合 caspase 使其发生泛素化降解, 从而抑制细胞凋亡^[9]。本研究结果显示, 缺氧性肺高血压时 PSMCs 凋亡减少, 肺组织 XIAP mRNA 表达增加, 提示 XIAP 可能在缺氧性 PH 的细胞凋亡抑制中起重要作用。

本研究还发现, TP 干预 4 周后肺小动脉 WT% 和 WA% 均明显降低, PSMCs 的凋亡增加, 而肺组织 XIAP mRNA 表达减少, 表明 TP 可减轻缺氧性 PH 的肺小动脉重塑, 增加 PSMCs 的细胞凋亡及降低肺组织 XIAP 表达水平, 提示 TP 可改善缺氧诱导的大鼠肺高血压, 可能与抑制肺组织 XIAP 表达从而促进 PSMCs 凋亡有关。有报道显示, TP 可通过下调胰腺癌细胞的 XIAP 表达水平促使 caspase 激活^[10], 从而促进细胞凋亡。因此, 作者推测 TP 可能通过抑制缺氧性肺高血压肺组织的 XIAP 表达来促进 PSMCs 凋亡。

综上所述, 本研究初步证实了 XIAP 参与缺氧诱导的大鼠肺高血压的发生发展过程, 而 TP 可能通过抑制 XIAP 表达促进 PSMCs 凋亡, 从而改善缺氧性肺高血压, 这为 PH 的防治提供了一个新方向。

参考文献:

- [1] Zaiman AL, Damico R, Thoms-Chesley A, et al. A critical role for the protein apoptosis repressor with caspase recruitment domain in hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 2011, 124(23):2533-2542.
- [2] Anwar A, Li M, Frid MG, et al. Osteopontin is an endogenous modulator of the constitutively activated phenotype of pulmonary adventitial fibroblasts in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(1):L1-L11.
- [3] Hamid K. X-linked inhibitor of apoptosis: A chemoresistance factor or a hollow promise [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(18):4496-4502.
- [4] Tang GQ, Yan TQ, Guo W, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis and suppresses proliferation by inhibiting the human Indian Hedgehog pathway in human chondrosarcoma cells [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(8):1179-1185.
- [5] Srinivasan P, Suchalatha S, Babu PV, et al. Chemopreventive and therapeutic modulation of green tea polyphenols on drug metabolizing enzymes in 4-Nitroquinoline 1-oxide induced oral cancer [J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 172(3):224-234.
- [6] Phillipps HR, Hurst PR. XIAP: a potential determinant of ovarian follicular fate [J]. *Reproduction*, 2012, 144(2):165-176.
- [7] Flanagan L, Sebastia J, Tuffy LP, et al. XIAP impairs Smac release from the mitochondria during apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2010, 1:e49.
- [8] Schimmer AD, Dalili S, Batey RA, et al. Targeting XIAP for the treatment of malignancy [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(2):179-188.
- [9] Stefanie G, Colin S. XIAP as a Ubiquitin ligase in cellular signaling [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17(1):54-60.
- [10] Qanungo S, Das M, Haldar S, et al. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(5):958-967.

(收稿日期: 2012-11-05 修回日期: 2013-03-28)