

表没食子儿茶素没食子酸酯对高尿酸血症大鼠 血管内皮炎症因子的作用

谢 华, 陈 敏, 易 青, 霍 成, 朱晓雯, 张 俊, 孙建琴

(复旦大学附属华东医院营养科, 上海市 200040)

[关键词] 表没食子儿茶素没食子酸酯; 高尿酸血症; 炎症因子; 血管内皮

[摘要] 目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对高尿酸血症大鼠血管内皮炎症因子的作用。方法 将 36 只雄性 SD 大鼠分为正常对照组、模型对照组、EGCG 低剂量组、EGCG 中剂量组、EGCG 高剂量组、别嘌呤醇组, 5 周后, 运用 RT-PCR 检测大鼠主动脉 MCP-1、TNF- α 、ICAM-1、ET-1 及 eNOS 表达量, 以及大鼠血清尿酸、肌酐、尿素氮和黄嘌呤氧化酶(XO)水平。结果 模型对照组大鼠的血尿酸和 XO 水平显著高于正常对照组($P<0.01$), EGCG 各浓度组及别嘌呤醇组大鼠的血尿酸和 XO 水平与模型对照组相比较则有不同程度下降($P<0.01$)。模型对照组大鼠主动脉 MCP-1、TNF- α 、ICAM-1 的 mRNA 表达量较正常对照组显著升高($P<0.01$), EGCG 各浓度组和别嘌呤醇组大鼠主动脉 TNF- α 、ICAM-1 的 mRNA 表达量与模型对照组相比显著下降($P<0.01$), EGCG 高剂量组和别嘌呤醇组 MCP-1 mRNA 表达量与模型对照组相比显著下降($P<0.05$)。EGCG 中剂量组和别嘌呤醇组 ET-1 mRNA 表达量与模型对照组相比显著下降($P<0.05$)。结论 EGCG 干预可以降低高尿酸血症大鼠的血尿酸水平, 同时减少血管内皮炎症因子的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of epigallocatechin gallate on the inflammation of vascular endothelium in hyperuricemia rats

XIE Hua, CHEN Ming, YI Qing, HUO Cheng, ZHU Xiao-Wen, ZHANG Jun, SUN Jian-Qin

(Nutrilogy Department, Huadong Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China)

[KEY WORDS] Epigallocatechin gallate; Hyperuricemia; Inflammatory factors; Vascular endothelium

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on the inflammation of vascular endothelium in hyperuricemia rats. **Methods** Thirty-six male SD rats were divided into normal control group, model control group, EGCG low dose (EGCG-L) group, EGCG medium dose (EGCG-M) group, EGCG high dose (EGCG-H) group and allopurinol group. After five weeks, the expression of MCP-1, TNF- α , ICAM-1, ET-1 and eNOS in hyperuricemia rats were detected by RT-PCR, serum uric acid, creatinine, urea nitrogen and xanthine oxidase (XO) were determined. **Results** Compared with normal control group, the levels of serum uric acid and XO were increased in model control group ($P<0.01$). Compared with model control group, the levels of serum uric acid and XO were significantly decreased in EGCG-L group, EGCG-M group, EGCG-H group and allopurinol group ($P<0.01$). Compared with normal control group, the mRNA expression of MCP-1, TNF- α and ICAM-1 was markedly increased in model control group ($P<0.01$). The expression of MCP-1 mRNA in EGCG-H group and allopurinol group was markedly decreased as compared with model control group ($P<0.05$). Compared with model control group, the expression of TNF- α , ICAM-1 mRNA was significantly decreased in EGCG-L group, EGCG-M group, EGCG-H group and allopurinol group ($P<0.01$). The mRNA expression of ET-1 in EGCG-M group was also decreased significantly ($P<0.01$). **Conclusion** EGCG attenuated serum uric acid and the inflammation of vascular endothelium in hyperuricemia rats.

[收稿日期] 2016-03-21

[修回日期] 2016-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81100603)

[作者简介] 谢华, 博士, 副主任医师, 研究方向为高尿酸血症的营养防治, E-mail 为 xiehua_dr@163.com。通讯作者孙建琴, 硕士, 教授, 研究方向为老年慢性疾病的营养防治, E-mail 为 jianqins@163.com。

高尿酸血症是遗传因素和环境因素相互作用引起的与生活方式密切相关的代谢性疾病。高尿酸血症不仅可以演变为痛风导致关节和肾实质损伤,还与冠心病、高血压、脑卒中、糖尿病、肥胖、代谢综合征等慢性病密切相关^[1-2]。内皮细胞功能障碍是高尿酸相关疾病的共同发病机制之一,其中炎症反应是主要环节^[3]。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是茶叶中含量最多的多酚类物质,可减少包括核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、白细胞介素1(interleukin-1, IL-1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素8(interleukin-8, IL-8)、一氧化氮(nitric oxide, NO)及巨噬细胞趋化因子等炎症因子水平^[4]。本课题组使用维生素C和茶多酚复合营养素干预高尿酸血症伴糖脂代谢异常人群,结果显示干预组尿酸(uric acid, UA)和C反应蛋白(C-reactive protein, CRP)水平显著下降^[5]。另外,本课题组在体外细胞研究中证实,EGCG可减少尿酸诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)炎症因子的表达,包括单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、TNF- α 、细胞间黏附分子1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、NF- κ B及环氧酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)^[6],但是否在体内也如此呢?故本研究旨在高尿酸血症大鼠中观察EGCG对尿酸所致血管内皮炎症的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

SD大鼠购自上海斯莱克实验动物中心;氧嗉酸(oxonic acid, OA)、尿酸、多聚甲醛购自美国Sigma公司;EGCG购自杭州怡倍嘉茶叶科技有限公司(纯度 $\geq 98\%$);别嘌呤醇片购自上海信谊万象药业股份有限公司;黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)试剂盒购自美国Cayman公司;Trizol试剂购自美国Invitrogen公司;RT-PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;PCR引物。

1.2 动物分组

36只雄性SD大鼠,体重 254.5 ± 11.7 g。适应性喂养1周后,根据体重应用随机数字表法将大鼠随机分为六组,每组6只:①正常对照组:给予常规喂水,每天根据体重按照1.5 mL/100 g使用蒸馏水灌胃1次;②模型对照组:0.1 mmol/L尿酸溶液替代正常饮用水,同时根据体重按照1.5 mL/100 g使用

3.4% OA溶液灌胃,每天1次;③EGCG低剂量组(EGCG-L组):3.4% OA+0.1 mmol/L尿酸上午灌胃1次,EGCG 50 mg/(kg·d)下午灌胃1次;④EGCG中剂量组(EGCG-M组):3.4% OA+0.1 mmol/L尿酸上午灌胃1次,EGCG 100 mg/(kg·d)下午灌胃1次;⑤EGCG高剂量组(EGCG-H组):3.4% OA+0.1 mmol/L尿酸上午灌胃1次,EGCG 200 mg/(kg·d)下午灌胃1次;⑥别嘌呤醇组:30 mg/(kg·d)别嘌呤醇溶液灌胃1次。实验第1天作为第0周,每周称体重1次,根据体重调整给药剂量,持续5周。于实验0周、2周、4周、5周时采集大鼠尾静脉血液1 mL,在离心机上以3000 r/min离心15 min,分离血清置于 -80°C 冰箱备用。实验第5周结束时2%戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉处死大鼠,收集血液,在离心机上以3000 r/min离心15 min。以每管500 μ L进行分装血清,置于 -80°C 冰箱备用。并分离大鼠主动脉,用于RT-PCR检测。

1.3 血清学检测

血清肌酐(creatinine, Cr)、尿素氮(urea nitrogen, BUN)及尿酸采用Bechman全自动生化分析仪测定。

1.4 黄嘌呤氧化酶检测

采用免疫荧光方法检测。首先用1×XO sample buffer将血清稀释100倍,然后根据说明书配置浓度为0、20、40、60、80、100等6个校准品。接着在XO detector中加入200 μ L DMSO配成工作液。在HRP中加入200 μ L纯水配成工作液。混合上述液体:Assay buffer(9.8 mL)、detector(100 μ L)、HRP(100 μ L)。每孔各加入标准品或待测样品50 μ L后,每孔再加入50 μ L MIX,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育45 min。于激发波长535 nm,发射波长595 nm进行检测。以标准品为横坐标,荧光值为纵坐标,画出标准曲线。根据样品荧光值在该曲线图上查出待检测蛋白含量。

1.5 RT-PCR检测

用Trizol方法提取主动脉总RNA,逆转录为cDNA,采用SYBRGreen嵌合荧光进行实时定量PCR,反应体系25 μ L。MCP-1上游引物为5'-GCAGGTCTCTGTCACGCTTC-3',下游引物为5'-CT-TGTTCTGCTCCAGTTTCT-3',扩增产物为281 bp;ICAM-1上游引物为5'-CGACGCTTCTTTTGCTCTGC-3',下游引物为5'-ACCATTCATCTCCCGTTGA-3',扩增产物为264 bp;TNF- α 上游引物为5'-CTCT-TCTGTCTACTGAACCTTCGGG-3',下游引物为5'-ACGTGGGCTACGGGCTTGT-3',扩增产物146 bp;ET-1上游引物为5'-GCGCGTCGTCCCGTAT-3',下游引物为5'-GGCCTCCAACCTTCTTAGTTT-3',扩增产

物 283 bp; eNOS 上游引物为 5'-CCTCTGCACTAT-GGGGTCTG-3', 下游引物为 5'-TCTCAATGTCGTG-TAATCGGTCT-3'。内参 GAPDH 上游引物为 5'-TG-GCATGGACTGTGCTCATG-3', 下游引物为 5'-TGGGTGTGAACCACGAGAAA-3', 扩增产物为 144 bp。按照试剂盒说明书逆转录后进行 PCR 扩增, 反应条件: 95.0℃ 预变性 30 s, 95.0℃ 变性 5 s, 60.0℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 同时获取荧光, 共 40 个循环, 每组重复 3 次, 反应结束后行产物熔解曲线分析, 以 GAPDH 作为内参进行分析。

1.6 统计学分析

数值变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组样本均数比较采用方差分析, 两组间均数比较采用双尾 Student *t* 检验。当 $P < 0.05$ 时, 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG 对高尿酸血症大鼠血尿酸的影响

实验第 0 周, 各组血尿酸水平无统计学差异。第 2 周, 除了正常对照组, 其它各组均不同程度出现血尿酸水平升高, 但各组仍无统计学差异。第 4 周, 模型对照组血尿酸水平较正常对照组显著升高 ($P < 0.01$), EGCG 各浓度组和别嘌呤组血尿酸水平也显著升高, 但较模型对照组下降, 其中 EGCG 中剂量组、EGCG 高剂量组和别嘌呤组血尿酸水平与模型对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。第 5 周, 模型对照组血尿酸水平进一步升高, 而 EGCG 各浓度组和别嘌呤组血尿酸水平无进一步升高, 且与模型对照组相比均明显下降 ($P < 0.01$; 图 1)。

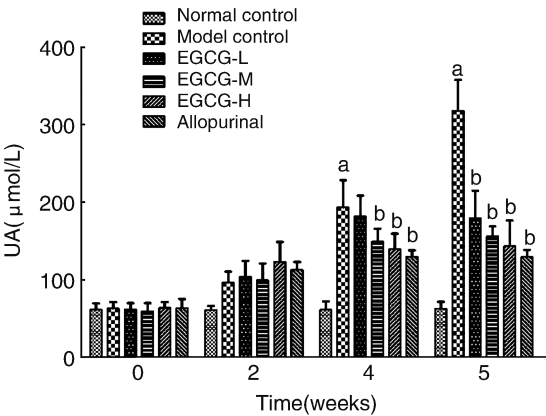


图 1. EGCG 对高尿酸血症大鼠血尿酸水平的影响 a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型对照组比较。
Figure 1. Effect of EGCG on serum uric acid in hyperuricemia rats

2.2 EGCG 对高尿酸血症大鼠血 Cr 和 BUN 的影响

各组第 0 周血 Cr 和 BUN 水平无统计学差异; 第 2、4、5 周, 各组血 Cr 和 BUN 水平虽然有些波动, 但未有统计学意义 (图 2)。

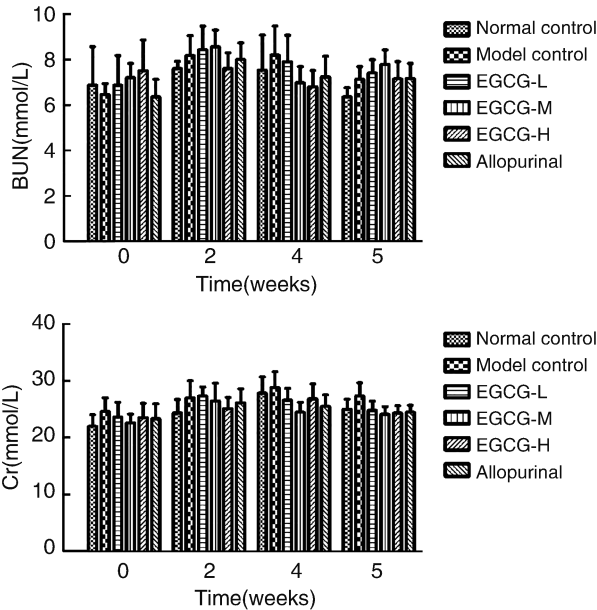


图 2. EGCG 对高尿酸血症大鼠血 Cr 和 BUN 水平的影响
Figure 2. Effect of EGCG on serum Cr and BUN in hyperuricemia rats

2.3 EGCG 对高尿酸血症大鼠血清 XO 水平的影响

XO 是尿酸生成过程中的关键酶, 其活性高低直接影响尿酸的生成。第 5 周, 模型对照组血清 XO 水平显著高于正常对照组 ($P < 0.01$)。EGCG 各浓度组血清 XO 水平与模型对照组比较则有不同程度下降, 其中 EGCG 中剂量组和 EGCG 高剂量组下降更为明显 ($P < 0.01$)。别嘌呤醇是 XO 的抑制剂, 故别嘌呤醇组血清 XO 水平下降最为显著 ($P < 0.01$; 图 3)。

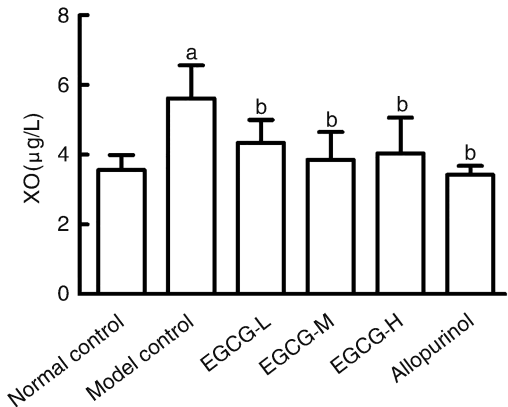


图 3. EGCG 对高尿酸血症大鼠血清 XO 水平的影响 a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型对照组比较。
Figure 3. Effect of EGCG on serum XO in hyperuricemia rats

2.4 EGCG 对高尿酸血症大鼠主动脉炎症因子 mRNA 表达的影响

模型对照组 MCP-1、TNF- α 及 ICAM-1 的 mRNA 表达量比正常对照组显著升高 ($P<0.01$)。EGCG 各浓度组和别嘌呤组 TNF- α 和 ICAM-1 的 mRNA 表达量与模型对照组相比显著下降 ($P<0.01$)。EGCG

高剂量组和别嘌呤组 MCP-1 mRNA 表达量与模型对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。EGCG 中剂量组和别嘌呤组 ET-1 mRNA 表达量与模型对照组相比显著下降 ($P<0.05$)。而 eNOS mRNA 表达量在 EGCG 干预后比模型对照组有所降低,但无统计学差异 ($P>0.05$;图 4)。

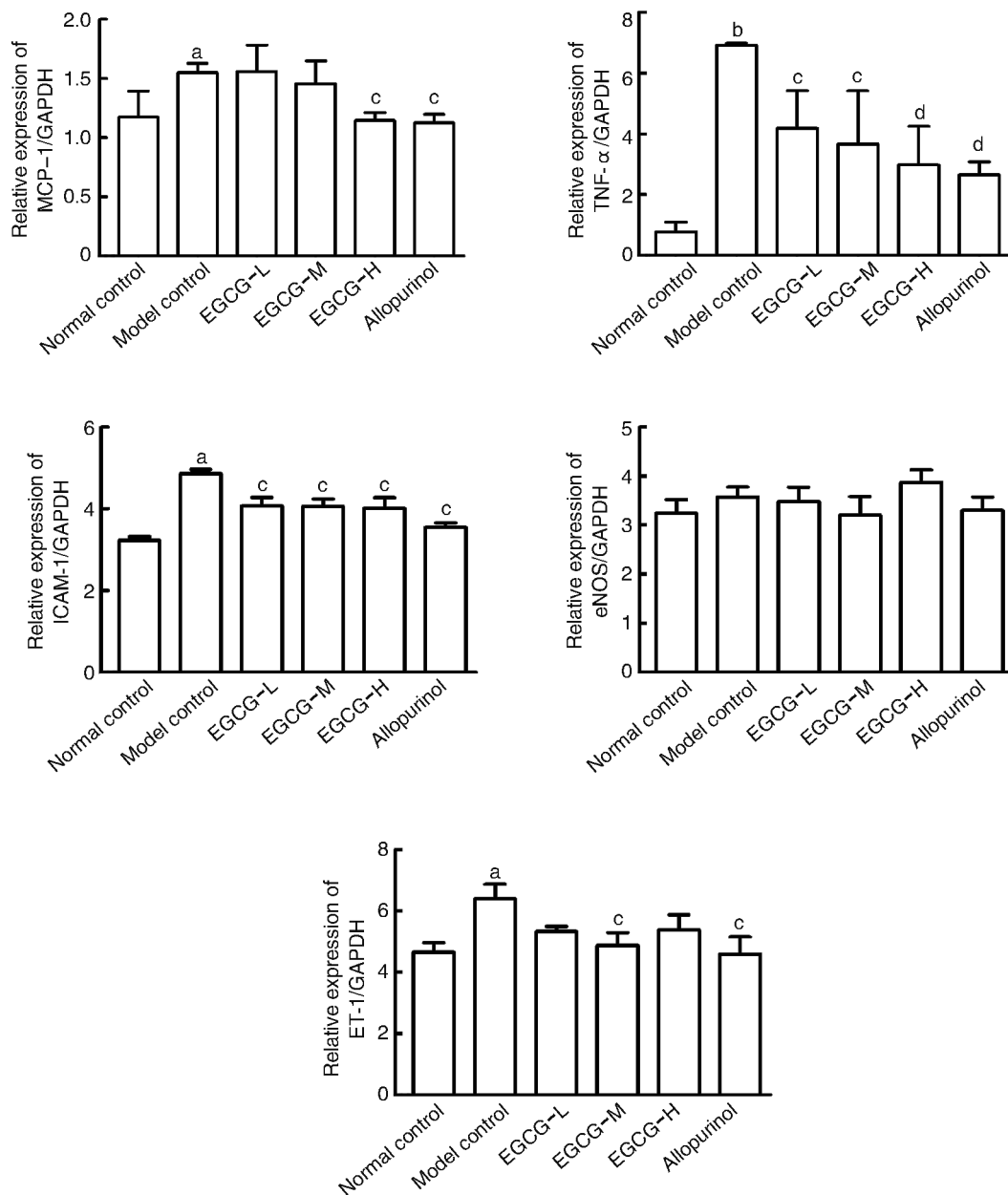


图 4. EGCG 对高尿酸血症大鼠主动脉炎症因子 mRNA 表达的影响 a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与模型对照组比较。

Figure 4. Effect of EGCG on the expression of inflammation cytokines in the aorta of hyperuricemia rats

3 讨论

近年来随着我国生活水平的提高和饮食结构

的改变,高尿酸血症的患病率显著增高,并呈现年轻化的趋势。大部分研究表明高尿酸血症与心血管疾病、糖尿病、脑卒中密切相关^[7]。针对这一情

况,2009 年我国发布《无症状高尿酸血症合并心血管疾病诊治建议专家共识》,提出无症状高尿酸血症合并心血管疾病患者需要及时降低尿酸治疗,以改善心血管疾病的预后。

高尿酸血症时,炎症反应参与了血管内皮功能障碍的发生发展^[8]。体内及体外研究表明血尿酸可以从多个方面引起血管内皮炎症反应。首先尿酸可直接损伤血管内皮细胞,引起内皮炎症反应。尿酸是一种水溶性物质,在血液中物理溶解度很低,高尿酸血症时,尿酸结晶易析出,沉积于血管壁损伤血管内皮,痛风性关节炎是尿酸引起炎症的直接证据。其次尿酸可激活细胞内炎症信号途径导致血管内皮细胞损伤。研究发现,尿酸能通过血管平滑肌细胞上阴离子通道进入细胞内,激活 NF- κ B,刺激 COX-2、MCP-1 等炎症因子释放,从而促进内皮细胞炎症反应^[9-10]。此外,尿酸还能促进内皮细胞 ICAM-1 表达增加。前期细胞研究表明,尿酸可以引起 HUVEC 中 NF- κ B 的表达增高,并且随着尿酸浓度的增加,NF- κ B 表达量也增加。与此同时,NF- κ B 下游诱导的一系列炎症因子 TNF- α 、IL-6、MCP-1、ICAM-1 在尿酸的作用下表达量也明显升高^[11]。而本研究发现,在高尿酸血症大鼠体内,模型对照组的 MCP-1、ICAM-1 和 TNF- α 均比正常对照组显著增高。

EGCG 是茶叶中含量最多的多酚类物质,也是生物学效应最强的一种。研究显示茶多酚抗血管壁炎症作用比较明确,茶多酚可减少包括 NF- κ B、IL-1、TNF- α 、IL-8、NO 等炎症因子的产生^[12-13]。在动脉粥样硬化动物实验中,茶多酚及其单体 EGCG 能够通过有效抑制 NF- κ B 活性减少炎症因子 IL-1p、TNF- α 、MMP-2、MMP-9 基因表达,保护血管内皮细胞^[14]。在对人内皮细胞的研究中发现,EGCG 还能够显著抑制羧基佛波醇乙酯(PMA)引起的 MCP-1 表达,呈现剂量依赖关系,并发现其机制很可能是 EGCG 抑制了 p38 促分裂原活化蛋白激酶和 NF- κ B 的活化^[15],故 EGCG 可通过抑制 NF- κ B 及其下游炎症因子的表达保护血管内皮功能。在体外 HUVEC 中,用 EGCG 预处理 HUVEC 后,NF- κ B 下游炎症因子 MCP-1、ICAM-1、TNF- α 表达均显著降低^[6]。本研究中,模型对照组 MCP-1、ICAM-1、TNF- α 的 mRNA 表达比正常对照组明显升高,采用 EGCG 干预后,EGCG 各浓度组 TNF- α 和 ICAM-1 的 mRNA 表达量与模型对照组相比显著下降,EGCG 高剂量

组 MCP-1 的 mRNA 表达量与模型对照组相比显著下降,表明高尿酸时可促进内皮细胞促炎症因子、黏附分子表达,而这一过程可使单核细胞和中性粒细胞对内皮细胞的黏附增强,并随后浸润到血管内膜下,转变为巨噬细胞,由此导致内皮细胞炎症反应。而尿酸似乎参与引发炎症的级联反应,最终促进血栓形成。

此外,本研究结果还发现,从第 4 周开始,模型对照组血尿酸水平比正常对照组明显升高。EGCG 三个剂量组、别嘌呤醇组与模型对照组相比,尿酸则没有进一步升高。第 5 周时,EGCG 三个剂量组和别嘌呤醇组血尿酸均显著下降,其中 EGCG 高剂量组下降最显著。各组之间的 Cr 和 BUN 从实验开始到实验结束均无显著性差异。表明 EGCG 干预可降低高尿酸血症大鼠体内的尿酸,而不会影响大鼠的肾功能。动物实验研究结果也与本课题组之前人群干预结果研究一致^[5]。同时,其他学者用茶色素进行小样本量高尿酸血症临床干预也证实茶色素能降低尿酸^[16-17]。还有研究表明 EGCG 能抑制 XO^[18],这可能是其降低尿酸的主要作用之一。本研究检测了各组之间血清 XO 水平,结果发现 EGCG 各浓度组血清 XO 水平均比模型对照组显著降低,表明 EGCG 确实能够降低 XO 活性。

综上所述,EGCG 对高尿酸血症大鼠血管内皮细胞具有抑制炎症反应的作用,并且能够降低血尿酸水平。这为今后利用 EGCG 进行降低尿酸治疗的临床运用提供了一定的科学证据,未来仍然需进一步研究 EGCG 在高尿酸血症炎症信号通路中的网络调控机制。

[参考文献]

- [1] Krishnan E. Interaction of inflammation, hyperuricemia, and the prevalence of hypertension among adults free of metabolic syndrome: NHANES 2009-2010[J]. J Am Heart Assoc, 2014, 3(2): e000157
- [2] Kuwabara M. Hyperuricemia, cardiovascular disease, and hypertension[J]. Pulse (Basel), 2016, 3(3-4): 242-252.
- [3] 李葵花,王喜福,李璐,等. 高尿酸血症与动脉粥样硬化的关系研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(1): 85-89.
- [4] Romeo L, Intrieri M, D'Agata V, et al. The major green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces heme oxygenase in rat neurons and acts as an effective neuroprotective agent against oxidative stress[J]. J Am Coll Nutr, 2009, 28 (Suppl): 492S-499S.

- [5] 谢华, 戢璐, 陈敏, 等. 茶多酚和维生素C联合补充对高尿酸血症伴脂代谢异常者的改善效果研究[J]. 营养学报, 2010, 32(6): 575-578.
- [6] Xie H, Sun J, Chen Y, et al. EGCG attenuates uric acid-induced inflammatory and oxidative stress responses by medicating the NOTCH pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 214836.
- [7] 程飞, 廖新学, 陶军. 血尿酸与冠心病的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(9): 757-760.
- [8] Iso T, Kurabayashi M. Extremely low levels of serum uric acid are associated with endothelial dysfunction in humans [J]. *Circ J*, 2015, 79(5): 978-980.
- [9] Han HJ, Lim MJ, Lee YJ, et al. Uric acid inhibits renal proximal tubule cell proliferation via at least two signaling pathways involving PKC, MAPK, cPLA2, and NF-kappaB [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(1): F373-F381.
- [10] Kanellis J, Watanabe S, Li JH, et al. Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2[J]. *Hypertension*, 2003, 41(6): 1287-293.
- [11] Kanellis J, Kang DH. Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease[J]. *Semin Nephrol*, 2005, 25(1): 39-42.
- [12] Gu LT, Yang J, Su SZ, et al. Green tea polyphenols protects cochlear hair cells from ototoxicity by inhibiting Notch signalling[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(6): 1211-219.
- [13] Li J, Ye L, Wang X, et al. Epigallocatechin gallate inhibits endotoxin-induced expression of inflammatory cytokines in human cerebral microvascular endothelial cells [J]. *J Neuro inflammation*, 2012, 9: 161.
- [14] Yang J, Han Y, Chen C, et al. EGCG attenuates high glucose-induced endothelial cell inflammation by suppression of PKC and NF-kB signaling in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Life Sci*, 2013, 92(10): 589-597.
- [15] Wang Y, Wang B, Du F, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates oxidative stress and inflammation in obstructive nephropathy via NF-kappaB and Nrf2/HO-1 signalling pathway regulation [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2015, 117(3): 164-172.
- [16] 厉兰娜, 王翠莲, 朱惠芳, 等. 茶色素干预原发性痛风性高尿酸血症的临床观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(2): 154-155.
- [17] 谢幼荣, 徐萍, 薛培丽, 等. 茶色素与吉非贝齐治疗高脂血症和高尿酸血症的比较[J]. 中国新药与临床杂志, 2000, 19(1): 25-27.
- [18] Aucamp J, Gaspar A, Hara Y, et al. Inhibition of xanthine oxidase by catechins from tea (*Camellia sinensis*) [J]. *Anticancer Res*, 1997, 17(6D): 4381-385.
- (此文编辑 文玉珊)