文章编号:1000-5404(2007)14-1381-03

论著

茶多酚预防缺氧大鼠红细胞增多症的实验研究

罗 红[1],高文祥[2],高钰琪[2],刘福玉[2],李 鹏[1] (第三军医大学高原军事医学系:[1]高原卫生学教研室,[2]病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨茶多酚(tea polyphenols, TP)对缺氧大鼠红细胞增多症的预防作用。**方法** 雄性Wistar大鼠,分为平原组、慢性缺氧组、高剂量TP(20 mg/kg)+慢性缺氧组、低剂量TP(10 mg/kg)+慢性缺氧组。大鼠在5 000 m高原环境模拟舱中,间断缺氧(12 h/d),每2天1次腹腔注射$CoCl_2$溶液(5.5 mg/kg)以建立红细胞增多症模型。经颈动脉插管取血,然后测定大鼠红细胞数、血红蛋白和红细胞压积,并进行血流变学及动脉血气分析。**结果** ①红细胞增多症模型组大鼠的红细胞数、血红蛋白和红细胞压积显著增加,全血黏度等血流变学指标显著上升;②与模型组相比,慢性缺氧大鼠的红细胞数、血红蛋白和红细胞压积值均明显下降,且高剂量TP组较低剂量组显著,但仍高于平原组;同时TP可以改善缺氧大鼠血流变学指标,降低全血黏度及红细胞刚性指数等;但TP对缺氧大鼠的血氧饱和度等血气值没有影响。**结论** TP对缺氧大鼠红细胞增多症有一定预防作用,提示TP对高原红细胞增多症可能有类似作用。

关键词: 茶多酚;缺氧;红细胞增多症
中图法分类号: R282.71;R364.4;R555.101 **文献标识码:** A

Protective effects of tea polyphenols on polycythemia induced by chronic hypoxia in rats

LUO Hong[1], GAO Wen-xiang[2], GAO Yu-qi[2], LIU Fu-yu[2], LI Peng[1] ([1]Department of Hygiene, [2]Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the protective effects of tea polyphenols (TP) on chronical hypoxia induced polycythemia in rats. **Methods** Wistar rats were divded into 4 groups: (1) the normoxia group, (2) chronical hypoxia group, (3) low dose TP (10 mg/kg) group, (4) high dose TP (20 mg/kg) group. To establish the model of polycythemia, rats in (2), (3) and (4) were exposed to intermittent hypoxia, at simulated altitude of 5 000 m 12 h/d for 40 days, and were given $CoCl_2$ 5.5 mg/kg intraperitoneal administration every other day. At the end of the experiment, RBC, HG, HCT and the value of the blood rheology were detected, and arterial blood gas analysis were also done by the analysator. **Results** The value of RBC, HB and HCT in TP groups were all decreased significantly, and the effects of 20 mg/kg TP was more significant than that of 10 mg/kg Furthermore, TP also decreased the whole blood viscosity and RBC rigidity index in chronical hypoxia rats, which indicated that TP is good to the the blood rheology in chronical hypoxia rats. However, it wasn't significant that the effects of TP on the value of arterial blood gas such as SaO_2 in chronical hypoxia rats ($P > 0.05$). **Conclusion** TP may have protective effects on chronical hypoxia induced polycythemia in rats.

Key words: tea polyphenols; hypoxia; polycythemia

茶多酚(tea polyphenols,TP)是从茶叶中提取的多酚类物质,是茶叶的重要风味物质及生理活性成分,作为一种高效低毒的天然抗氧化剂,目前在食品工业中已得到广泛应用。除抗氧化作用外,临床及实验研究还表明TP可有效降低高血压、冠心病、恶性肿瘤、胃肠道疾病等患者血液的全血黏度、血浆黏度、红细胞压积,改善血液流变及微循环,抑制患者血液高黏滞状态,从而避免了疾病的恶性循环[1,2]。高原红细胞增多症(high altitude polycythemia, HAPC)是由高原缺氧导致红细胞代偿亢进而过度增生,血液流变异常,患者的血液具有浓、黏、聚的特点,是一种常见的慢性高原

基础项目:全军医学科研"十一五"计划专项课题(06Z037);第三军医大学科研创新基金(2003)
Supported by the Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA(06Z037) and the Scientific Research Fund of Third Military Medical University of China(2003)

作者简介:罗 红(1970-),女,四川省大竹县人,博士研究生,讲师,主要从事高原营养学方面的研究。电话:(023)68753714,E-mail: rona764@sohu.com
通讯作者:高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail: gyq@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-04-24;修回日期:2006-11-08

病。氧化应激损伤是引起高原缺氧损伤(包括红细胞结构和功能损伤)的重要机制之一[3-5],红细胞结构和功能损伤在HAPC发病机制中有重要作用。我们推测TP的抗氧化活性和改善血液流变作用可能会对HAPC有影响。

现通过研究TP对慢性缺氧大鼠红细胞增多症的影响,为寻找防治HAPC的新途径提供一定实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar大鼠50只,雄性,体质量180~200 g,SPF级,购于本校大坪医院野战外科研究所实验动物中心。

1.1.2 药品、试剂 TP:纯度98%,其中儿茶素含量80%,表没食子儿茶素没食子酸脂(epigallocatechin, gallate, EGCG)含量45%,购于浙江东方茶业科技有限公司。氯化钴($CoCl_2$,成都)、肝素钠(成都),乌来糖(氨基甲酸乙脂,浙江)。

1.1.3 器材、设备 乙二胺四乙酸二钾盐(EDTA-K_2, Ethylenediaminetetraacetic acid-dipotassium salt)真空采血管、肝素钠真空采血管为山东威高集团公司生产。全功能自动血流变仪为北京(普利生)LBY-N6B型;自动血细胞分析仪为日本Sysmex-21型;血气分析仪为美国IL1620型。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养 标准大鼠饲料,购于本校大坪医院野战外科研究所实验动物中心。自由进食、进水,尤其保证充足饮水。

1.2.2 试剂配制 TP用消毒三蒸水配制成0.5%,0.22 μm的微孔滤膜过滤除菌,4 ℃、避光保存,1周内有效。$CoCl_2$溶液贮存浓度0.11%,高压蒸汽消毒后4 ℃保存。肝素钠配制浓度0.3%。

1.2.3 实验分组及给药 50只大鼠用随机排列表分成4组:平原组(海拔221 m,$n=8$)、慢性缺氧组($n=14$)、TP(20 mg/kg)+慢性缺氧组(高TP组,$n=14$)、TP(10 mg/kg)+慢性缺氧组(低TP组,$n=14$)。每2天皮下注射1次TP,平原对照组和慢性缺氧组给等量消毒蒸馏水。

1.2.4 红细胞增多症动物模型复制 慢性缺氧组、高TP组、低TP组置于高原环境模拟舱中,5 000 m、12 h/d, 40 d;每2天腹腔注射1次$CoCl_2$溶液5.5 mg/kg(单日给$CoCl_2$,双日给TP)。造模结束时,在模拟高原4 000 m的低压氧舱内采取动脉血和取材。

1.2.5 红细胞、血流变学及血气分析 大鼠经10%乌来糖麻醉后,经颈总动脉导管取血,用EDTA-K_2真空采血管采血,然后用血细胞分析仪测定红细胞数、血红蛋白和红细胞压积等值;肝素钠真空采血管采血,用全功能自动血流变仪进行血流变学分析;肝素钠抗凝取血,样本密封,放于2~4 ℃保温瓶中,立即送血气分析室进行血气分析,全血黏度分别在高切率150(1/s)、中切率60(1/s)、低切率10(1/s)下测定。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 12.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 红细胞数、血红蛋白和红细胞压积的测定

测定结果见表1。慢性缺氧组与平原组比较,红细胞数、血红蛋白和红细胞压积值分别增加44.9%、72.9%、76.3%;低剂量TP组各值增加率依次为28.0%、43.1%、51.6%,高剂量TP组为17.6%、26.3%、34.4%,与慢性缺氧组比较,两TP处理组各值均存在统计显著性差异。结果显示,缺氧使大鼠红细胞数、血红蛋白和红细胞压积值均显著增加,TP则能够显著降低缺氧大鼠的红细胞数、血红蛋白和红细胞压积增加率,且高剂量TP的作用大于低剂量TP。增加率=(实验组-平原组)/平原组×100%。

表1 茶多酚对缺氧大鼠血液RBC、HB和HCT值的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	RBC(10^{12}/L)	HB(g/L)	HCT
平原组	8	7.43±0.39	129.8±8.78	0.416±0.028
慢性缺氧组	14	10.76±0.68[a]	224.4±13.93[a]	0.733±0.042[a]
低剂量TP组	14	9.50±0.93[ab]	185.7±12.02[ac]	0.630±0.039[ab]
高剂量TP组	14	8.74±0.67[acd]	164.0±13.21[acd]	0.559±0.062[acd]

a: $P<0.01$,与平原组比较;b: $P<0.05$, c: $P<0.01$, 与慢性缺氧组比较;d: $P<0.05$, 与低剂量TP组比较

2.2 血流变学分析

TP可使缺氧大鼠高、中、低切全血黏度均降低($P<0.05$, $P<0.01$),且有剂量效应关系($P<0.05$),但TP对缺氧大鼠毛细管血浆黏度没有明显影响($P>0.05$),说明TP主要是通过影响血细胞黏度而改变全血黏度;TP可显著降低缺氧大鼠的红细胞刚性指数($P<0.05$),说明TP可减少或防止缺氧对大鼠红细胞变形能力损伤。见表2。

表2 茶多酚对缺氧大鼠血液流变学指标的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	全血黏度(mPa.s)			毛细管血浆黏度	红细胞刚性指数
		高切率	中切率	低切率		
平原组	8	5.26±0.69	7.14±0.98	14.57±2.27	1.09±0.14	9.26±1.10
慢性缺氧组	14	17.34±3.10[a]	17.74±2.64[a]	33.18±7.16[a]	1.69±0.57[b]	13.68±0.45[a]
低剂量TP组	14	13.38±1.98[bd]	14.28±1.78[bd]	26.64±2.36[bd]	1.51±0.16[a]	10.56±1.14
高剂量TP组	14	11.19±2.57[bce]	11.99±1.92[bce]	21.96±3.73[bce]	1.77±0.36[a]	9.39±2.30

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$,与平原组比较; c: $P<0.01$, d: $P<0.05$, 与慢性缺氧组比较; e: $P<0.05$, 与低剂量TP组比较

2.3 血气分析

与平原对照组相比,慢性缺氧组和TP组的pH值、PaO_2、SaO_2、$PaCO_2$均有改变($P<0.05$, $P<0.01$),但TP对缺氧大鼠的血气值没有明显影响($P>0.05$)。见表3。

表3 茶多酚对缺氧大鼠血气值的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	pH	PaO_2(mmHg)	SaO_2(%)	$PaCO_2$(mmHg)
平原组	8	7.37±0.02	106.00±8.41	97.90±0.61	37.21±2.39
慢性缺氧组	14	7.28±0.04[b]	74.30±6.96[a]	92.76±2.76[b]	23.94±4.21[a]
低剂量TP组	14	7.27±0.08[b]	69.22±7.45[a]	90.78±4.06[b]	21.78±5.04[a]
高剂量TP组	14	7.28±0.01[b]	70.43±9.05[a]	91.41±4.14[a]	24.73±5.50[a]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$,与平原组比较

3　讨论

HAPC 患者由于缺氧导致红细胞代偿亢进而过度增生，且缺氧时红细胞变形性亦下降，使得血液黏滞度增高，血液的高凝状态进一步加重组织器官淤血、缺氧，形成一种恶性循环。本实验运用 Wistar 大鼠复制 HAPC 动物模型，通过研究 TP 对慢性缺氧大鼠红细胞增多症的预防作用，为寻找防治 HAPC 的新途径提供一定实验依据。

单纯低压缺氧难以使大鼠发生红细胞增多症，$CoCl_2$可使组织细胞发生缺氧而促进红细胞代偿性增加，参考姜平等[6]的方法，本实验运用低压舱模拟海拔 5 000 m 高度(12 h/d，40 d)和注射 $CoCl_2$溶液复制出高原红细胞增多症的动物模型，同时设立茶多酚(TP)＋慢性缺氧组，以观察 TP 对大鼠红细胞增多症的预防作用。结果显示茶多酚可显著降低实验大鼠的红细胞数、血红蛋白值和血球压积，同时可以降低实验大鼠的血液黏滞度和保护红细胞变形性，提示茶多酚对缺氧大鼠红细胞增多症有一定预防或抑制作用。

一般认为，人类 HAPC 的诊断标准是红细胞 $>6.5\times10^{12}$、血红蛋白 >200 g/L、红细胞压积 >65%，同时联系临床症状，但少见大鼠红细胞增多症诊断标准的报道。本研究中造模大鼠红细胞数为(10.76 ± 0.68)$\times10^{12}$，血红蛋白(224.4 ± 13.9) g/L，红细胞压积(0.73 ± 0.04)，增加率依次为 44.9%、72.9%、76.3%，显著高于对照组($P<0.01$)。与平原组相比，各实验组大鼠精神状态较差，有些大鼠唇周、耳色黯红，鼻、眼有出血现象，与 HAPC 患者的“多血面容”极相似。个别严重者畏寒少动、反应迟钝、被毛蓬松无光泽、体瘦，而这些情况在慢性缺氧组更为明显，TP 处理组症状则较轻。参考人类 HAPC 的诊断标准，结合造模大鼠的临床症状，我们认为本实验的动物模型复制方法是可行的。

实验结果显示 TP 可以显著降低慢性缺氧大鼠的高、中、低切全血黏度，对血浆黏度没有明显影响，降低红细胞刚性指数。血液黏滞度由血细胞和血浆黏度构成，红细胞产生的黏度远高于血浆黏度，对红细胞增多症来说，红细胞黏度实际上是影响其血液黏度的主要因素。红细胞刚性指数反映红细胞变形能力，其值越小，红细胞变形性越好。本实验提示 TP 对缺氧大鼠红细胞变形性的降低有一定抑制或减少作用。大鼠全血黏度降低和红细胞变形能力增加使其血液原本的高凝状态得到改善，组织器官淤血、缺氧相对减轻，进而红细胞代偿相对减弱。全血黏度降低可能主要是由于 TP 使红细胞数减少、红细胞变形性相对增加等因素造成的。此外，TP 可以降低血浆纤维蛋白原，稳定抗凝血酶活性，改善动脉内皮损伤，抗血小板凝聚，从而具有抗凝血、促纤溶作用[2]，这可能也缺氧大鼠的血液流变及微循环改善的重要原因之一。

实验结果亦提示：TP 对缺氧大鼠红细胞变形性的改善可能也是 TP 预防缺氧大鼠红细胞增多症的作用机制之一。

组织缺氧可通过激活黄嘌呤氧化酶系统使氧自由基增多，体内脂质过氧化反应增加。氧自由基的增多使红细胞结构和功能发生异常，膜流动性和变形能力降低[5]。体外研究表明，TP 对离体红细胞的氧自由基损伤有显著抑制作用[7]，可保护黄嘌呤氧化酶、过氧化氢和紫外线照射等自由基产生体系诱导的红细胞膜脂质过氧化损伤，维持红细胞膜的结构完整性和正常功能[8]。人体研究显示，TP 能清除人体内在高原产生的大量氧自由基，提高氧利用率，增强人对高原耐力，促进高原习服[9,10]。因此，TP 的抗氧化作用可能是其保护缺氧大鼠红细胞变形性及其他缺氧损伤的重要机制。本实验表明 TP 不能改善缺氧大鼠的 SaO_2等血气值，提示 TP 不是通过该途径发挥其预防红细胞增多症的作用。总之，有关 TP 对大鼠红细胞增多症的防治作用及机制值得我们进一步探讨。

参考文献：

[1] 华　琼，侯勇谋，高　华，等. 茶多酚片改善原发性肾病综合征患者血液流变学的临床观察[J]. 河南中医药学刊，1997，12(5)：47－48.

[2] 刘　玲，杨新生，岳京丽. 茶色素对血液流变学作用的临床观察[J]. 河南诊断与治疗杂志，1998，12(3)：150－151.

[3] Moller P，Loft S，Lundby C，*et al*. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans[J]. FASEB J，2001，15(7)：1181－1186.

[4] Maiti P，Singh S B，Sharma A K，*et al*. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain[J]. Neurochem Int，2006，49(8)：709－716.

[5] Gonzalez G，Celedon G，Escobar M，*et al*. Red cell membrane lipid changes at 3 500 m and on return to sea level[J]. High Alt Med Biol，2005，6(4)：320－326.

[6] 姜　平，贾守宁，徐国治，等. 高原红细胞增多症大鼠疾病模型的复制[J]. 高原医学杂志，1996，6(2)：19－22.

[7] 蒋建伟，何文珊，严玉霞，等. 茶多酚的离体抗氧化作用[J]. 中国病理生理杂志，1999，15(6)：522－524.

[8] 陈小夏，何　冰，张健泓. 茶多酚对红细胞膜脂质过氧化损伤的保护作用[J]. 中国中医基础医学杂志，1999，5(8)：28－31.

[9] Nagornev S N，Sytnik S I，Bobrovnitskii I P，*et al*. Pharmacological correction of lipid peroxidation during hypoxia and possibility to enhance human resistance to high altitude by using preparations of the metabolic type of action[J]. Vestn Ross Akad Med Nauk，1996，3(7)：53－60.

[10] 罗新民，余　杰，李诗伟. 茶多酚抗氧化剂对高原习服的影响[J]. 临床军医杂志，2001，29(3)：43－45.

(编辑　栾　嘉)