基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0889-03

茶多酚与艾司洛尔对缺氧联合 Ang-2 所致内皮细胞分泌内皮素保护作用的比较研究

蒙 果,李鸣皋,马贵喜,刘 玉,李 靖,吕晓宁
(北京海军总医院海军航空潜水医学中心,北京 100037)

【摘 要】目的:比较茶多酚与艾司洛尔对缺氧联合 Ang-2 致内皮细胞分泌内皮素(Endothelin,ET)的保护作用。方法:将培养的血管内皮细胞分为 4 组,分别为①对照组;②缺氧 +Ang-2 组;③缺氧 + Ang-2+ 茶多酚组;④缺氧 +Ang-2+ 艾司洛尔组,每组 8 个样本,用放射免疫法测定作用前、作用后 0.5、6、24 h 各组内皮素含量。结果:①缺氧 +Ang-2 组与对照组比较血管内皮素明显升高($P<0.01$);②缺氧 +Ang-2+ 茶多酚组同缺氧 +Ang-2 组比较血管内皮素显著降低($P<0.01$);③缺氧 +Ang-2+ 艾司洛尔组同缺氧 +Ang-2 组比较血管内皮素显著降低($P<0.01$);④缺氧 +Ang-2+ 茶多酚组与缺氧 +Ang-2+ 艾司洛尔组比较血管内皮素浓度降低在 0.5 h 无差异($P>0.05$),但在 6 h 和 24 h 差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:缺氧联合 Ang-2 可导致血管内皮细胞分泌内皮素功能增强;茶多酚和艾司洛尔对缺氧联合 Ang-2 对内皮细胞的损害均有保护作用,茶多酚的保护作用强于艾司洛尔。

【关键词】茶多酚;艾司洛尔;血管内皮细胞;内皮素;缺氧;Ang-2
【中国图书分类法分类号】R966 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-12-30

Different protective effect between tea polyphenol and esmolol on vascular endothelial cells secreting endothelin induced by hypoxia combined Ang-2

MENG Guo, et al
(*Aviation & Diving Medical Center of Navy General Hospital PLA*)

【Abstract】*Objective*: To compare the protective effect of Tea polyphenol with that of esmolol on vascular endothelial cells secreting endothelin induced by hypoxia combined Ang-2. *Methods*: Vascular endothelial cells were divided into 4 groups that included control group, hypoxia+Ang-2 group, hypoxia+Ang-2+tea polyphenol group, hypoxia+Ang-2+esmolol group, and each group comprised eight samples. The changes of endothelin expression level were measured with radioimmunoassay at the time of 0.5 h, 6 h, and 24 h. *Results*: ①The level of endothelin expression in hypoxia+Ang-2 group was higher significantly than that in the control group ($P<0.01$); ②The level of endothelin expression in the hypoxia+Ang-2+tea polyphenol group was lower significantly than that in hypoxia+Ang-2 group ($P<0.01$); ③The level of endothelin expression in the hypoxia+Ang-2+esmolol group was lower significantly than that in hypoxia+Ang-2 group($P<0.01$); ④There was not different in level of endothelin expression between the hypoxia+Ang-2+tea polyphenol group and the hypoxia+Ang-2+ esmolol group at the time of 0.5 h after hypoxia combined Ang-2 ($P>0.05$), but there was significantly different at the time of 6 h and 24 h after hypoxia combined Ang-2 ($P<0.01$). *Conclusion*: Both hypoxia combined Ang-2 can induce obvious change of endothelin expression level in endothelial cell and this change can be reduced significantly by tea polyphenol and esmolol, the protective effect of tea polyphenol is more obvious compared with that of esmolol.

【Key words】Tea polyphenol; Esmolol; Vascular endothelial cell; Endothelin; Hypoxia; Ang-2

内皮素(Endothelin,ET)是体内广泛分布的血管活性多肽,也是血管内皮损伤的标志物之一。以往的研究表明 Ang-2 和缺氧对内皮细胞分泌内皮素分别都有促进作用,茶多酚和艾司洛尔对内皮细胞均有保护作用,但在缺氧联合 Ang-2 的作用条件下,观察不同药物对内皮细胞分泌内皮素的保护作用未见报道。本研究采用培养的人大动脉血管内皮细胞(Vascular endothelial cells,VEC),通过低压舱模拟缺氧,比较在缺氧联合 Ang-2 条件下茶多酚和艾司洛尔对 VEC 分泌 ET 的保护作用。

作者介绍:蒙 果(1973-),男,主治医师,研究方向:航空航天与航海医学。
通讯作者:李鸣皋,男,教授,E-mail:liminggao6899@yahoo.com.cn。
基金项目:海军后勤科研基金(00-3321)。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

低压舱(由本院高压氧治疗中心提供),细胞培养箱(A-sheville1NC 公司),超净工作台(北京冠鹏净化设备有限公司),24 孔细胞培养板(丹麦 NUNC 公司),血管内皮细胞(CBI 公司提供的 VEC 体系),血管内皮细胞培养液及内皮细胞生长因子(CBI 公司配套提供),Ang-2(sigma 公司),茶多酚(由浙江农业大学茶学系馈赠),艾司洛尔(齐鲁制药厂),内皮素放免试剂盒(由华英放免技术研究所提供)。

1.2 内皮细胞的培养与传代

细胞取回后按照常规方法进行细胞复苏,调整细胞合适浓度,接种于 75 cm^2 细胞培养瓶中,放置于细胞培养箱中进行培养,待细胞长满瓶底后,用胰酶消化、传代。当细胞传至第 3 代时,将细胞接种于 24 孔板中(接种密度为 5 000 个/cm^2),继续培养,待细胞生长融合后,准备进行干预实验。

1.3 实验分组及处理

将培养的内皮细胞按每组 8 例样本分为 4 组:对照组、缺氧 + Ang-2 组、缺氧 + Ang-2+ 茶多酚组、缺氧 + Ang-2+ 艾司洛尔组。(1)对照组:为细胞培养液不加特殊试剂,也不受缺氧因素影响,于缺氧 +Ang-Ⅱ组缺氧前、后相对应的时间点取上清液 100 μl,待测定 ET 浓度;(2)缺氧 +Ang-2 组:于缺氧前将 Ang-2 加入细胞培养液中,使培养液中 Ang-2 浓度为 10^{-5} mol/L,然后置于低压舱内上升至 5 000 m 高度,停留 30 min 造成缺氧。分别于联合干预前和联合干预后 0.5、6、24 h 取上清液 100 μl;(3)缺氧 + Ang-2+ 茶多酚组:于缺氧前将 Ang-2 加入细胞培养液中,使培养液中 Ang-2 浓度为 10^{-5} mol/L,再加入茶多酚,使茶多酚浓度为 50 μg/L,然后同缺氧 +Ang-2 组一起置于低压舱内上升至 5 000 m 高度,停留 30 min 造成缺氧。同样分别于联合干预前和联合干预后 0.5、6、24 h 取上清液 100 μl;(4)缺氧 + Ang-2+ 艾司洛尔组:于缺氧前将 Ang-2 加入细胞培养液中,使培养液中 Ang-2 浓度为 10^{-5} mol/L,再加入艾司洛尔,使艾司洛尔浓度为 5 mg/L,然后同缺氧 + Ang-2 组一起置于低压舱内上升至 5 000 m 高度,停留 30 min 造成缺氧。同样分别于联合干预前和联合干预后 0.5、6、24 h 取上清液 100 μl。上述各组标本抽取后,均置于用抑肽酶处理过的离心管中,-20℃低温保存,待测定 ET 浓度。

1.4 ET 的测定

细胞培养上清液 ET 浓度由华英放免技术研究所采用放免方法测定。由专人用同一批试剂完成(单位:ng/L)。

1.5 统计学处理

数据均用 SPSS11.0 统计软件包处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析和 q 检验,检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 缺氧+Ang-2 对内皮细胞分泌 ET 的影响

缺氧 +Ang-2 组与空白对照组比较,缺氧后 0.5、6、24 h 3 个时间点的 ET 含量均显著增高($P < 0.01$),表明缺氧联合 Ang-2 可引起血管内皮细胞分泌 ET 含量的显著增加(见表 1)。

2.2 茶多酚对缺氧 +Ang-2 所致内皮细胞分泌 ET 的影响

缺氧 +Ang-2+ 茶多酚组同缺氧 +Ang-2 组比较,在缺氧后的 0.5、6、24 h 3 个时间点ET含量均低于缺氧 +Ang-2 组($P< 0.01$)。结果提示茶多酚可显著降低缺氧联合 Ang-2 引起血管内皮细胞分泌ET的增高,对缺氧联合 Ang-2 引起的内皮细胞损害有保护作用(见表 1)。

2.3 艾司洛尔对缺氧+Ang-2 所致内皮细胞分泌 ET 的影响

缺氧 +Ang-2+ 艾司洛尔组同缺氧 +Ang-2 组比较,在缺氧后的 0.5、6、24 h 3 个时间点ET含量均低于缺氧 +Ang-2 组($P< 0.01$)。结果提示艾司洛尔可显著降低缺氧联合 Ang-2 引起血管内皮细胞分泌 ET 的增高,对缺氧联合 Ang-2 引起的内皮细胞损害有保护作用(见表 1)。

2.4 茶多酚和艾司洛尔对缺氧+Ang-2 所致内皮细胞分泌 ET 的影响比较

缺氧 +Ang-2+ 茶多酚组同缺氧 +Ang-2+ 艾司洛尔组比较血管 ET 在 0.5 h 浓度降低无差异($P>0.05$),但在 6 h 和 24 h 浓度降低差异有统计学意义($P<0.01$),前者作用更强(见表 1)。

3 讨 论

血管内皮细胞是位于循环血液与血管壁内皮下组织间的单层扁平细胞,并非单纯血液与组织间进行物质交换的屏障,而且能分泌和释放许多生物活性物质,参与多种生理和病理过程。血管内皮细胞是目前评价血管损伤特异而且直接

表 1 茶多酚与艾司洛尔对缺氧联合 Ang-2 所致内皮细胞分泌 ET 保护作用的比较研究(n=8, $\bar{x}$±s, ng/L)

分组	作用前	作用后不同时间点		
		0.5 h	6 h	24 h
空白对照组	1.30 ± 0.56	1.53 ± 0.57	1.50 ± 0.32	1.42 ± 0.56
缺氧 +Ang-2 组	1.42 ± 0.46	3.35 ± 0.20[a]	6.50 ± 0.13[a]	4.16 ± 0.22[a]
缺氧 +Ang-2 组 + 茶多酚组	1.42 ± 0.32	2.84 ± 0.80[b]	3.72 ± 0.48[b]	2.49 ± 0.20[b]
缺氧 +Ang-2 组 + 艾司洛尔组	1.37 ± 0.20	2.67 ± 0.27[cd]	4.89 ± 0.32[ce]	3.38 ± 0.30[ce]

a:同对照组比较 P<0.01;b:同缺氧 +Ang-2 组比较 P<0.01;c:同缺氧 +Ang-2 组比较 P<0.01;
d:同缺氧 +Ang-2 组 + 茶多酚组比较 P>0.05;e:同缺氧 +Ang-2 组 + 茶多酚组比较 P<0.01

的指标[1,2]。缺氧是多种疾病和损伤发生发展过程中的中心环节之一，也是很多病理过程产生的结果，同时缺氧又可进一步导致一系列的病理生理变化。Ang-2 在肾素－血管紧张素系统中是直接作用于血管床使血管收缩的重要的血管活性肽，它可促进平滑肌细胞增殖和迁移，在高血压、动脉硬化和心衰等临床疾病中具有重要的病理、生理意义。

ET是由血管内皮细胞分泌的含有 21 个氨基酸残基的多肽，是体内最强的血管收缩物质。当血管内皮细胞受到理化损伤时其分泌增加，反之ET的升高又可使内皮细胞受到破坏[3]。研究表明[4]，在很多疾病及应激状态下，ET的浓度均显著升高，ET 参与了冠状动脉痉挛、动脉粥样硬化、心肌梗死、肺动脉高压、高血压等疾病的发病。研究表明[3]当血管内皮细胞受到机械、化学或免疫因素损害时，其结构和功能即可发生改变，内皮细胞脱落，产生内皮细胞血症，同时内皮素释放。在缺氧联合 Ang-2 的作用下，内皮细胞更易受损，这些损伤因素对ET分泌具有协同作用[5]。

茶多酚是茶叶药效的主要活性成分，近年来的大量实验研究证实，茶多酚具有消除自由基、抗氧化等生物活性。目前的研究证实[6]，茶多酚对心脑血管疾病的保护机制主要与其抗氧化、抗凝、促纤溶和抑制血小板聚集、降低血液粘度、调节前列腺素、血栓素等作用密切相关。我们以往的实验也证实茶多酚具有抑制缺氧及 Ang-2 引起血管内皮细胞分泌 ET 的作用[7]。

艾司洛尔是一种新型短效选择性 β_1 受体阻滞剂，具有起效快(分布半衰期 2 min)，作用时间短(消除半衰期 9 min)，作用很快逆转等特点，同时可阻断 α 受体，预防血中儿茶酚胺浓度增高所致的心血管反应，并改善左心功能，降低循环阻力[8]。目前国内外已广泛用于治疗室上性快速性心律失常、急性冠脉综合征以及围手术期高血压、心动过速、心肌缺血等。本实验结果，缺氧 +Ang-2+ 艾司洛尔组同缺氧 +Ang-2 组比较在缺氧后的 0.5、6、24 h 3 个时间点ET含量均低于缺氧 +Ang-2 组($P<0.01$)，提示艾司洛尔可显著降低缺氧联合 Ang-2 引起血管内皮细胞分泌ET的增加，对缺氧联合 Ang-2 引起的内皮细胞损害有保护作用。

本实验发现茶多酚和艾司洛尔对内皮细胞均有保护作用，但将茶多酚与艾司洛尔对血管内皮细胞的保护作用进行比较发现：茶多酚在 6 h 和 24 h降低ET作用较艾司洛尔更强。出现上述结果主要的原因推测可能与茶多酚成分比较复杂有关，茶多酚主要包括黄烷酮、黄酮醇、花青素和酚酸，其中儿茶素占 60%～80%。儿茶素主要有儿茶素(C)、没食子儿茶素(GC)、表儿茶素(EC)、表没食子儿茶素(EGC)、表儿茶素没食子酸酯(ECG)和表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG) 6 种。其中前 4 种称为非酯型儿茶素，后 2 种称酯型儿茶素。联苯三酚型儿茶素比邻位型儿茶素的抗氧化效力强。由于茶叶中酯型儿茶素含量最高，因而茶叶中主要的有效抗氧化成分是酯型儿茶素[9,10]。茶多酚抗氧化、清除自由基等作用具有多种途径及机制，这可能是茶多酚较艾司洛尔对缺氧合并 Ang-2 致内皮细胞分泌ET影响的保护作用显著的另一主要原因。目前，关于茶多酚抗氧化等作用机制研究比较清楚的有如下几点：①茶多酚属多酚结构，具有较强的络合金属离子的性能，可通过络合细胞内钙，降低钙浓度而抑制黄嘌呤氧化酶的生成，从而起到抗氧化作用[11]；②茶多酚是超氧阴离子自由基和羟自由基很强的捕获剂[11]；③茶多酚可抑制肿瘤细胞中 NADPH- 细胞色素还原酶及细胞色素 P450 活化系统的活性，TP 对这些氧化酶的抑制作用可预防病理条件下自由基的爆发性发生[12]；④超氧化物歧化酶、过氧化物酶、谷胱甘肽过氧化酶等抗氧化酶对自由基有高效的清除作用，防止活性氧对机体的损伤，茶多酚不但能保护体内的抗氧化酶，还可促进和激活体内抗氧化酶活性[10]。而艾司洛尔成分单一，对内皮细胞可能仅通过拮抗 β_1 受体，减轻细胞内钙超载，降低氧自由基，保护缺氧内皮细胞[13,14]。但确切的作用机制还需要进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Liu H Q, Zhang X M, Wei X B. Apoptosis and it's, mechanism of bovine cerebral *microvessel endothelial cells induced by angiotension* Ⅱ [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2003, 17(2): 121-125.

[2] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. Physiol Re, 2002, 82(1): 47-95.

[3] Wang J J, Liu S M, Chen R, et al. A novel effect of lobeline on vascular smooth muscle cell: inhibition of proliferation induced by endothelin21[J]. Pharmazie, 2007, 62(8): 620-624.

[4] 孔 霞. 血管内皮细胞与动脉粥样硬化[J]. 郴州医学高等专科学校学报, 2002, 4(4): 55-58.

[5] 李鸣皋，马贵喜，孙运峰. 血管紧张素－Ⅱ对急性缺氧使血管内皮细胞分泌内皮素的影响基金钠多的保护作用研究[J]. 中国全科医学, 2005, 8(19): 1575-1581.

[6] Frei B, Higdon J V. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies [J]. J Nutr, 2003, 133(10): 3275－3284.

[7] 刘 玉，孙运峰，马贵喜. 茶多酚对血管紧张素Ⅱ所致血管内皮细胞分泌内皮素功能的影响[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(12): 1408-1410.

[8] Suzuki S, Nonaka A, Abe S. Effect of esmolol on cardiovascular responses induced by scopolamine butylbromide [J]. Masui, 2005, 54(11): 1277-1281.

[9] 朱桂勤，李建科. 茶多酚的功能研究进展[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(1): 33-35.

[10] 周 晞，李平华. 茶多酚抗晶状体上皮细胞凋亡的体外研究及机制[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(2): 190-192, 203.

[11] Sesso H D, Gaziano J M, Buring J F, et al. Coffee and teaintake and the risk of myocardial infarction[J]. Am J Pidemiol, 1999, 149(2): 162- 167.

[12] 王景梓，王 岗，徐贵发，等. 茶多酚的药理研究[J]. 食品与药品, 2006, 8(3): 23- 26.

[13] Zou D Q, Chang Y T, Li L, et al. Effect of esmolol on beta-adrenoceptor desensitization during cardiac surgery [J]. Chin J Anesthesiol, 2002, 22(2): 75-79.

[14] Zou D Q, Chang Y T, Lv Z P, et al. The protective effect of esmolol on the myocardium during cardiacvalve replacem ent in Chinese patients[J]. Chin J Anesthesiol, 2002, 18(9): 470-472.

(责任编辑：冉明会)