

## 绿茶多酚对兔主动脉粥样硬化斑块中磷酸化 p38MAPK 的影响

刘洪<sup>1</sup>, 唐旭<sup>1</sup>, 汤志梅<sup>1</sup>, 唐曦<sup>2\*</sup><sup>1</sup>成都医学院校医院; <sup>2</sup>成都医学院临床医学院医学影像系, 成都 610500

**摘要:**探讨绿茶多酚(GTP)对动脉粥样硬化(AS)兔主动脉粥样硬化斑块中磷酸化 p38MAPK 的影响。将雄性纯种新西兰大白兔随机分为 3 组:对照组、AS 组和 GTP + AS 组。用组织病理学和血管超声检查评价建模情况, Western blot 检测 p38MAPK 磷酸化水平,应用酶联免疫法检测 TNF- $\alpha$  的水平。与对照组比较, AS 组 TNF- $\alpha$  水平和 p38MAPK 磷酸化水平增高 ( $P < 0.01$ ), 给予 GTP 干预后, TNF- $\alpha$  水平和 p38MAPK 磷酸化水平降低 ( $P < 0.01$ )。GTP 有延缓 AS 斑块进展, 抑制炎症反应的作用, 其机制与阻断 p38MAPK 通路的活化有关。

**关键词:**绿茶多酚; 动脉粥样硬化; p38MAPK; 信号传导

中图分类号: R543.3

文献标识码: A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.9.020

## Effect of Green Tea Polyphenols on Phosphorylated p38MAPK in Experimental Atherosclerosis Rabbits

LIU Hong<sup>1</sup>, TANG Xu<sup>1</sup>, TANG Zhi-mei<sup>1</sup>, TANG Xi<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Hospital of College; <sup>2</sup>Department of Medical Imageology, Clinical School of Chengdu Medical College, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China

**Abstract:** To investigate the effect of green tea polyphenols (GTP) on phosphorylated p38MAPK in experimental atherosclerosis (AS) rabbits. Pure healthy male New Zealand white rabbits were randomly divided into 3 groups: Control group; feeding ordinary granulated feed; AS group; high-fat diet combined immune injury; GTP + AS group; in addition to the high-fat diet combined immune injury, green tea polyphenol was given 100 mg/kg · d. Histopathology and vascular ultrasound examination were used to evaluate AS in experimental rabbits. Western blot was used to detect the expression of phosphorylated p38MAPK (p-p38MAPK), and enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the secretion of TNF- $\alpha$  in experimental rabbits. Compared with control group, the level of TNF- $\alpha$  and p-p38MAPK were significantly increased ( $P < 0.01$ ). After giving GTP, the level of TNF- $\alpha$  and p-p38MAPK were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). GTP can delay AS plaque progression and suppresses inflammation, these effects were possibly related to inhibit p38MAPK signal pathway activation.

**Key words:** GTP; atherosclerosis; p38MAPK; signal transduction

随着国民生活水平的提高, 动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)导致的心脑血管疾病已成为我国人口的主要死亡原因。鉴于 AS 病因尚未完全确定, 因此, 从发病机制上寻找突破点, 对于以 AS 为基础病变的疾病的防治具有重要意义<sup>[1]</sup>。目前获得广泛认可的发病机制是以“内皮损伤反应学说”为基础的炎症理论, 在 AS 病变发生发展直至血栓形成的各个阶段, 炎症反应起着重要作用<sup>[2]</sup>。绿茶多酚(green tea polyphenols, GTP)有很强的抗炎作用, 能

抑制许多致 AS 的炎症细胞与因子, 而这些炎症细胞与因子均与 p38MAPK (p38 mitogen activated protein kinase, p38MAPK) 信号通路的调控有关。目前, 尚未见到 GTP 通过抗炎来抑制 AS 病变进展的作用是否与 p38MAPK 信号通路有关的报道。本实验旨在探讨 GTP 抗兔主动脉粥样硬化的作用和可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

纯种健康雄性新西兰大白兔 30 只, 约 2 月龄, 体重  $2.3 \pm 0.6$  kg, 购自简阳达硕动物科技有限公司, 合格证号: SCXK(川)2013-17。

收稿日期: 2017-04-18 接受日期: 2017-06-06

基金项目: 四川省教育厅科研项目资助课题(15ZB0251); 四川省卫生科研项目资助课题(120472)

\* 通信作者 E-mail: lh7821@sina.com

## 1.2 主要试剂和设备

绿茶多酚 (Solarbio 公司), 胆固醇 (Solarbio 公司), 蛋黄粉 (Solarbio 公司), 猪油 (自制), 胎牛血清 (Solarbio 公司), SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (Solarbio 公司), Rabbit Anti GAPDH (booster 公司), TNF- $\alpha$  试剂盒 (酶联生物公司), 彩色多普勒 (GE Vivid E9), 全自动生化分析仪 (日本日立 7600 全自动生化分析仪), 倒置荧光相差显微成像系统 (日本 Olympus IX71)。

## 1.3 动物模型的建立与分组

按照高脂喂养联合免疫损伤方法, 饲高脂饲料 (88.5% 普通饲料 + 7.5% 蛋黄粉 + 6% 胆固醇 + 4% 猪油), 同时每周对实验兔肌肉注射胎牛血清蛋白, 剂量 250 mg/kg<sup>[3]</sup>, 建立 AS 动物模型。将成功建模后的实验兔按照随机数表随机分为三组, 每组 10 只: ①对照组: 喂普通饲料。②AS 组: 高脂喂养联合免疫损伤。③AS + GTP 组: 在 AS 组基础上, 给予绿茶多酚 100 mg/kg  $\cdot$  d<sup>[4]</sup>。

## 1.4 标本采集

### 1.4.1 血脂测定

实验前和喂养至 12 周时, 取血前一日晚禁食不禁水, 深麻状态下, 经耳缘静脉取血取血, 制备血浆。采用全自动生化分析仪测定血脂指标: 总胆固醇 (total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白 (low density lipoproteins, LDL)、高密度脂蛋白 (high density lipoproteins, HDL) 及甘油三酯 (triglyceride, TG)。

### 1.4.2 主动脉标本采集

实验 12 周末, 气体栓塞处死实验动物, 立即剖开胸腹腔分离主动脉, 采用 PBS 冲洗, 迅速离断主动脉根部至腹主动脉段, 取 1.5 ~ 2.5 cm 置于 2 mL EP 管管壁, 液氮中保存备 western blot 用; 另取一部分以 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋并予 5  $\mu$ m 连续切片行 HE 染色及免疫组化。

## 1.5 血管超声检查

实验 12 周末, 在处死实验动物之前, 深麻状态下采用 Vivid E9 超色多普勒分别对其髂外动脉及远端血管进行超声检查。

## 1.6 Western blot 法检测 P-P38 蛋白表达

将准备好的组织样本, 迅速剪成小片状组织, 加入高效组织裂解液, 机器匀浆, 于 -4  $^{\circ}$ C 低温离心机离心取上清。BCA 法蛋白定量。制备制备 SDS-PAGE 胶, 分别取三组蛋白, 电泳后, 转移至 PVDF 膜上, TBST 漂洗, 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育, 加入一抗和二抗, ECL 化学发光, 显影, 定影。Quantity One4. 62 凝胶定量软件处理胶片。P-P38 蛋白表达水平 = (各样本蛋白灰度/GAPDH 内参蛋白灰度)。

## 1.7 TNF- $\alpha$ 测定

实验前、实验 6 周时和实验 12 周末分别取兔耳缘静脉血, 采用酶联免疫法 (ELISA) 检测各组血清中 TNF- $\alpha$  的水平。

## 1.8 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS21.0 统计软件进行分析, 两组间均数比较采用 *t* 检验, 多组均数比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 实验结果

### 2.1 三组兔实验前后血脂的比较

实验前, 三组兔血浆 TC、TG、LDL 及 HDL 浓度差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。实验 12 周末, ①对照组: 兔血浆 TC、TG、LDL 及 HDL 浓度与实验前比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); ②AS 组: 兔血浆 TC、TG、LDL 及 HDL 浓度与实验前比较均升高 ( $P < 0.01$ ); ③AS + GTP 组: 兔血浆 TC、TG 和 LDL 浓度与 AS 组比较下降明显 ( $P < 0.01$ ); HDL 浓度与 AS 组比较有所升高 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。

表 1 血浆 TC、TG、LDL 及 HDL 的变化 (mmol/L,  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The changes of serum TC, TG, LDL and HDL (mmol/L,  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

血脂 Blood lipids	时间 Time	对照组 Control group	AS 组 AS group	GTP + AS 组 GTP + AS group
TC	实验前 Before experiment	1.13 $\pm$ 0.25	1.15 $\pm$ 0.22	1.25 $\pm$ 0.18
	12 周末 12 Weekends	1.29 $\pm$ 0.26	37.85 $\pm$ 0.95	22.24 $\pm$ 1.17
TG	实验前 Before experiment	0.94 $\pm$ 0.11	0.86 $\pm$ 0.09	0.90 $\pm$ 0.11
	12 周末 12 Weekends	0.91 $\pm$ 0.10	5.34 $\pm$ 0.66	2.77 $\pm$ 0.75
LDL	实验前 Before experiment	0.52 $\pm$ 0.15	0.52 $\pm$ 0.12	0.47 $\pm$ 0.13

续表 1 (Continued Tab. 1)

血脂 Blood lipids	时间 Time	对照组 Control group	AS 组 AS group	GTP + AS 组 GTP + AS group
	12 周末 12 Weekends	0.54 ± 0.11	15.50 ± 1.11	8.04 ± 0.35
HDL	实验前 Before experiment	0.59 ± 0.11	0.59 ± 0.07	0.59 ± 0.12
	12 周末 12 Weekends	0.61 ± 0.12	0.58 ± 0.22*	3.92 ± 0.46 <sup>#</sup>

注:12 周末,AS 组与对照组比较,\* $P < 0.01$ ,AS + GTP 组与 AS 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.01$ 。

Note: \* $P < 0.01$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs AS group.

## 2.2 三组兔血管超声比较

实验 12 周末,对所有兔进行血管超声检查。①对照组:髂外动脉及其远端血管管壁光滑,血管内透声性好,未见异常回声;②AS 组:髂外动脉近髂血管分叉处可探及高回声斑,后方声影不明显,CDFI 示:血流信号充盈缺损;③AS + GTP 组:髂外动脉及其远端血管管壁毛糙,血管内透声可,未见明显硬斑声

像。

## 2.3 三组兔组织病理学比较

实验 12 周末:①对照组:血管内皮下可见极少许吞噬脂质的泡沫细胞;②AS 组:血管内皮下见较多泡沫细胞,其中见散在淋巴细胞和大片状纤维斑块形成;③AS + GTP 组:泡沫细胞明显减少,纤维斑块消失(图 1)。

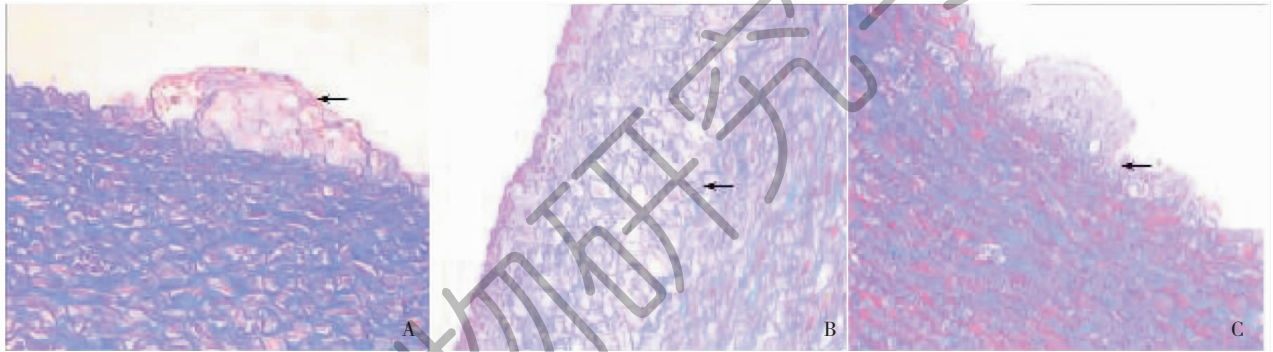


图 1 对照组(A)、AS 组(B)及 GTP + AS 组(C)兔组织病理学比较(Masson, ×200)

Fig. 1 The comparison of histopathology of control group (A), AS group (B) and GTP + AS group (C) (Masson, ×200)

## 2.4 三组兔 p-p38 蛋白表达的比较

实验 12 周末:AS 组 P-P38 蛋白表达最高,对照组 P-P38 蛋白表达最低。AS + GTP 组 p-p38 蛋白表

达较 AS 组低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 2,图 2)。

表 2 GTP 干预后 p-p38 蛋白表达及 TNF- $\alpha$  含量的变化( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 The changes of p-p38 expression and TNF- $\alpha$  after treated with GTP ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	时间 Time	p-p38	TNF- $\alpha$ (mmol/L)
对照组 Control group	6 周末 6 Weekends	-	0.7021 ± 0.0987
	12 周末 12 Weekends	22.47 ± 0.58	0.6633 ± 0.0864
AS 组 AS group	6 周末 6 Weekends	-	2.4197 ± 0.1011
	12 周末 12 Weekends	57.96 ± 0.53*	1.8444 ± 0.1541*
GTP + AS 组 GTP + AS group	6 周末 6 Weekends	-	2.4654 ± 0.1211
	12 周末 12 weekends	42.42 ± 0.82* <sup>#</sup>	1.2761 ± 0.0964* <sup>#</sup>

注:与对照组比较,\* $P < 0.01$ ;与 AS 组比较,<sup>#</sup> $P < 0.01$ 。

Note: \* $P < 0.01$  vs control group; <sup>#</sup> $P < 0.01$  vs AS group.

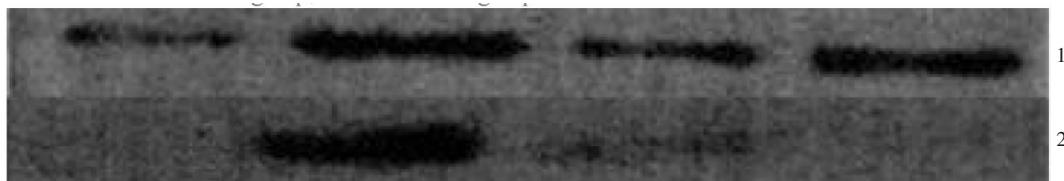


图2 P-P38 蛋白 Western blot 鉴定

Fig. 2 Identification of P-P38 by Western blot analysis

注:1:内参蛋白;2:P-P38

Note: Lane1 : GAPDH; Lane2 : P-P38

### 2.5 三组兔实验前后 TNF- $\alpha$ 含量的比较

实验前,三组兔血浆 TNF- $\alpha$  含量差异无统计学意义( $P > 0.05$ );实验 6 周末,AS 组和 AS + GTP 组 TNF- $\alpha$  含量较对照组均有所升高;实验 12 周末,AS 组和 AS + GTP 组 TNF- $\alpha$  含量较对照组均有所升高,但较 6 周末低,AS + GTP 组 TNF- $\alpha$  含量较 AS 组低,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )(表 2)。

## 3 讨论与结论

本实验结果显示,AS 组主动脉有 AS 病变的兔,其髂外动脉血管超声检查可探及高回声斑,后方声影不明显,且 CDFI 示血流信号充盈缺损。提示可采用血管超声检查来评估建模情况。AS + GTP 组兔血浆 TC、TG 和 LDL-C 浓度与 AS 组比较下降明显;HDL-C 浓度与 AS 组比较有所升高。提示 GTP 有调节血脂的作用,能降低血浆 TC、TG 和 LDL-C 浓度,升高 HDL-C 浓度。其机制可能与 GTP 促进细胞膜上 LDL 受体表达,加速脂蛋白分解有关<sup>[5]</sup>。

目前,对于 GTP 能抑制 AS 病变进展的机制,以抗氧化,增加低密度脂蛋白受体报道较多,而抗炎作用研究甚少<sup>[6]</sup>。GTP 有很强的抗炎作用,能抑制许多致 AS 的炎性细胞因子:包括肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 (IL-1)、一氧化氮(NO)及巨噬细胞趋化因子等<sup>[7]</sup>。而这些炎症细胞与因子均参与了 p38MAPK 信号通路的调控关<sup>[8]</sup>。

TNF- $\alpha$  作为致炎因子,可破坏血管内皮细胞结构和功能的完整性,在 AS 的发生和发展过程中发挥了中要作用<sup>[9,10]</sup>。本实验发现,实验 12 周末,AS 组兔血浆 TNF- $\alpha$  含量较实验前比较明显升高。提示高脂喂养联合免疫损伤引起了血管内皮的炎症反应,单核巨噬细胞活化,产生致炎因子包括 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和白细胞介素-6(IL-6)等,在 AS 病变发生发展

直至血栓形成的各个阶段,这些致炎因子均起着重要作用<sup>[11]</sup>。实验终末时,AS + GTP 组 TNF- $\alpha$  含量较 AS 组低。提示 GTP 能抑制致 AS 的炎症因子,其机制主要在于减少致炎因子的生成<sup>[12]</sup>。

p38MAPK 是控制炎症反应最主要的 MAPK 家族成员之一。在促炎细胞因子、紫外线、高渗透压等损伤因素的作用下,单核细胞、内皮细胞和中性粒细胞等炎细胞中的 p38MAPK,通过磷酸化被激活,激活后的 p38MAPK 移位入细胞核,使转录因子磷酸化<sup>[13]</sup>,从而调节许多致 AS 炎症细胞与因子。本实验结果显示,AS 组和 AS + GTP 组 p-p38 蛋白水平与实验前比较均有所升高,提示高脂喂养联合免疫损伤可激活 p38MAPK 信号通路。AS + GTP 组 p-p38 蛋白表达较 AS 组低;实验 12 周末,AS 组和 AS + GTP 组 TNF- $\alpha$  含量较实验前均有所升高,AS + GTP 组 TNF- $\alpha$  含量较 AS 组低。提示 GTP 可抑制 p38MAPK 的磷酸化,进而减少炎症因子 TNF- $\alpha$  的释放,起到抑制 AS 病变的作用。

综上所述,GTP 有延缓 AS 斑块进展,抑制炎症反应的作用,其机制与阻断 p38MAPK 通路的活化有关,提示 p38MAPK 有可能成为 AS 治疗的新靶点。至于比较明确的发挥抗炎效应的信号通路(NF- $\kappa$ B、AP-1、TLR/myd88 等)是否与 p38MAPK 信号通路“窜话”,有待于进一步研究。

### 参考文献

- 1 Li L(李靓),Xie W(谢巍),Jiang ZS(姜志胜), *et al.* The progress of the national preclinical research of atherosclerosis in the recent three years. *Chin J Arterioscler*(中国动脉硬化杂志),2015,11:1182-1188.
- 2 Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *New Engl J Med*,1999,340:115-126.
- 3 Tang X(唐曦),Gou B(苟博),Liu H(刘洪), *et al.* Green tea polyphenols of rabbit experimental study of inhibitory

- effect of atherosclerosis. *Med J West China* (西部医学), 2016, 2:177-180.
- 4 Deng ZY (邓祖跃), Kang H (康桦), Xin YF (辛艳飞), *et al.* Effects of tea polyphenols on the serum lipid and inflammation factor in experimental atherosclerosis rabbits. *Chin J Clin Pharmacol*, 2009, 3:279-282.
  - 5 Bursill CA, Roach PD. Modulation of cholesterol metabolism by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate in cultured human liver (HepG2) cells. *J Agric Food Chem*, 2006, 54:1621-1626.
  - 6 Chen D, Milacic V, Chen MS, *et al.* Tea polyphenols, their biological effects and potential molecular targets. *Histol Histopathol*, 2008, 23:487-496.
  - 7 Naito Y, Yoshikawa T. Green tea and heart health. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 54:385-390.
  - 8 Aomatsu T, Imaeda H, Takahashi K, *et al.* Tacrolimus (FK506) suppresses TNF-alpha-induced CCL2 (MCP-1) and CXCL10 (IP-10) expression via the inhibition of p38 MAP kinase activation in human colonic myofibroblasts. *Int J Mol Med*, 2012, 30:1152-1158.
  - 9 Chen YY, Hsu MJ, Hsieh CY, *et al.* Andrographolide inhibits nuclear factor-kappaB activation through JNK-Akt-p65 signaling cascade in tumor necrosis factor-alpha-stimulated vascular smooth muscle cells. *Sci World J*, 2014:130381.
  - 10 Jovinge S, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha activates smooth muscle cell migration in culture and is expressed in the balloon-injured rat aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17:490-497.
  - 11 Saely CH, Drexel H, Sourij H, *et al.* Key role of postchallenge hyperglycemia for the presence and extent of coronary atherosclerosis; an angiographic study. *Atherosclerosis*, 2008, 199:317-322.
  - 12 Byun EH, Omura T, Yamada K, *et al.* Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TLR2 signaling induced by peptidoglycan through the polyphenol sensing molecule 67-kDa laminin receptor. *FEBS Lett*, 2011, 585:814-820.
  - 13 Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol*, 2010, 661:3-38.

(上接第 1541 页)

- 10 Saghiri MA, Orangi J, Asaturian A, *et al.* Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis part III: (Ti, Li, Ce, As, Hg, Va, Nb and Pb). *Crit Rev Oncol/Hematol*, 2016, 98:290.
- 11 Saghiri MA, Asaturian A, Orangi J, *et al.* Functional role of inorganic trace elements in angiogenesis-Part II: Cr, Si, Zn, Cu, and S. *Crit Rev Oncol/Hematol*, 2015, 96:143-155.
- 12 Yang B (杨波), Wang ZG (王振国). Literature study on relationship between cold-heat nature of plant-based Chinese herbs and inorganic elements. *J Nanjing TCM Univ* (南京中医药大学学报), 2011, 27:109-111.
- 13 Konieczynski P, Arceusz A, Wesolowski M. Essential elements and their relations to phenolic compounds in infusions of medicinal plants acquired from different European regions. *Biol Trace Element Res*, 2016, 170:466-475.
- 14 Qiang ZZ (强正泽), Wang Y (王燕), Li CY (李成义), *et al.* Correlation analysis between contents of active ingredients and trace elements in Hedysari Radix from Gansu province. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2015, 27:1801-1810.
- 15 Qiang ZZ (强正泽), Li CY (李成义), Li S (李硕), *et al.* Identification of wild and cultivated Hedysari Radix based on trace elements. *Chin J Exp Tradit Med Formul* (中国实验方剂学杂志), 2016, 22(12):47-53.
- 16 Qiang ZZ (强正泽), Li CY (李成义), Li S (李硕), *et al.* Study on characteristics of trace elements of Hedysari Radix in different growth ages. *Chin J Infor TCM* (中国中医药信息杂志), 2016, 23(10):87-91.
- 17 Li CY (李成义), Qiang ZZ (强正泽), Wang Y (王燕), *et al.* Study on quality evaluation of Hedysari Radix from different producing areas in Gansu province based on the contents of 12 trace elements. *Chin J Infor TCM* (中国中医药信息杂志), 2016, 23(6):92-98.
- 18 Baxter I. Ionomics: studying the social network of mineral nutrients. *Curr Opinion Plant Biol*, 2009, 12:381-386.
- 19 Huang XY, Salt DE. Plant ionomics: From elemental profiling to environmental adaptation. *Molecul Plant*, 2016, 9:787-797.
- 20 The Official Committee of Hygiene Department of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典, 2015年, 一部). Beijing: China Medical Science Press, 2015. 302.
- 21 Li CY (李成义), Qiang ZZ (强正泽), Wang Y (王燕), *et al.* Study on characteristics of active ingredient of Hedysari Radix in different growth ages. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2015, 26:2497-2498.