

# 绿茶儿茶酚对活性氧和血管细胞增殖的影响研究

杨 红, 刘贻尧

(电子科技大学生命科学与技术学院 成都 610054)

**【摘要】**以内皮细胞、中膜平滑肌细胞和HL-60细胞(异常细胞模型),研究了绿茶儿茶酚对3种细胞增殖的影响。用次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶化学发光法研究了绿茶儿茶酚清除活性氧的效果。研究表明,1  $\mu\text{g/mL}$ 的绿茶儿茶酚略可促进内皮细胞增殖;1、3  $\mu\text{g/mL}$ 的绿茶儿茶酚对中膜平滑肌细胞增殖没有抑制作用;10  $\mu\text{g/mL}$ 的绿茶儿茶酚减少中膜平滑肌细胞数量。HL-60细胞数量的减少与绿茶儿茶酚浓度呈剂量效应关系。并发现绿茶儿茶酚对细胞活性氧的清除与剂量有关。

**关键词** 动脉粥样硬化; 细胞增殖; 绿茶儿茶酚; 活性氧

中图分类号 R965; Q27

文献标识码 A

doi:10.3969/j.issn.1001-0548.2011.01.028

## Effect of Green Tea Catechins on Vascular Cell Proliferation and Reactive Oxygen Species

YANG Hong and LIU Yi-yao

(School of Life Science and Technology, University of Electronic Science and Technology of China Chengdu 610054)

**Abstract** One of the most important causes of the atherosclerosis is reactive oxygen species (ROS) to induce lipide overoxidation, which leads to endothelial cells dysfunction and vascular smooth muscle cells (VSMCs) abnormal proliferation. Recent investigations demonstrated that polyphenon has prevention effect in the treatment of atherosclerosis or other vascular diseases. In this paper, endothelial cells (ECs), VSMCs and HL-60 cell (as the abnormal cell model) were used to investigate the effects of green tea catechins on the proliferation. Furthermore, the clearance ability of ROS by catechins was detected by hypoxanthine-xanthineoxidase chemiluminescence method. It was found that the green tea catechins could lightly increase ECs proliferation at the concentration of 1  $\mu\text{g/mL}$ , and green tea catechins of 1 and 3  $\mu\text{g/mL}$  have no obvious effect on VSMCs proliferation. However, green tea catechins of 10  $\mu\text{g/mL}$  significantly inhibited VSMCs proliferation. For HL-60 cells, the cell viability was presented in a dose-dependent manner. Similarly, the ROS clearance ability was also related to the dosage of green tea catechins.

**Key words** atherosclerosis; cell proliferation; green tea catechins; reactive oxygen species

心血管疾病是一类严重危害人们健康的疾病,造成心血管疾病很重要的一个原因是动脉粥样硬化。动脉粥样硬化指动脉内皮上由于脂质沉着,内皮细胞纤维化,功能紊乱;中膜平滑肌细胞和弹性组织变性,组织失去弹性,纤维组织取代弹性组织,引起动脉中膜病变。动脉粥样硬化的发生包括血液中脂质和活性氧反应,引起脂质过氧化,过氧化的脂质在内皮细胞上沉着,使内皮细胞受到伤害;在脂质沉积处,血小板富集,中膜平滑肌细胞向内皮细胞迁移并产生结缔组织,使内膜增厚。血液中的巨噬细胞聚集,并将过氧化的低密度脂蛋白吞噬,形成泡沫细胞,最终形成动脉硬化<sup>[1-2]</sup>。动脉粥样硬化的一个重要原因是中膜平滑肌细胞异常增殖,而

多酚类物质能抑制这一过程。多酚是绿茶、红茶、乌龙茶、红葡萄酒等都含有的物质,它具有抗氧化作用,能够抑制动脉硬化初期低密度脂蛋白氧化的功效<sup>[3-5]</sup>。

中国是最早使用茶叶的国家,茶具有兴奋中枢神经系统、恢复疲劳、通便、利尿等生理功效。茶叶中有用的成分很多,如最早发现的咖啡因、单宁物质、儿茶酚类等多酚物质、维生素C等。绿茶及抽提物含有的儿茶酚种类很多,有表儿茶酚、表没食子儿茶素、儿茶素多酚等<sup>[6]</sup>。近年来又发现绿茶有抗氧化作用,抗肿瘤细胞增殖,抑制血小板凝集等作用<sup>[7]</sup>。

活性氧是造成细胞老化、肿瘤发生、动脉硬化

收稿日期: 2009-11-16; 修回日期: 2010-03-05

基金项目: 国家自然科学基金(30700151)

作者简介: 杨 红(1974-),女,博士,主要从事生物物理和纳米医学等方面的研究。

的主要原因,生物体在代谢过程中产生活性氧。活性氧能造成机体多种损伤和病变,伤害生物体DNA等生物大分子,加速机体的衰老。活性氧种类很多,如超氧阴离子自由基、羟自由基、脂氧自由基、二氧化氮和一氧化氮自由基等。生物体本身具有清除多余自由基的能力,主要是靠内源性自由基清除系统,包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化酶等酶和外源性的维生素C、维生素E、还原性谷胱甘肽、胡萝卜素和硒等一些抗氧化剂<sup>[8]</sup>。儿茶酚类物质的抗氧化作用主要在于B环上的酚基能供给氢除去自由基。一分子的自由基与氢发生反应使自由基安定,连锁反应停止,生成酚氧自由基,最后生成稳定的醌类物质<sup>[9]</sup>。

本文使用的内皮细胞和中膜平滑肌细胞是从猪的主动脉分离得到。HL-60细胞是人急性骨髓性白血病患者末梢血分离的骨髓球样细胞,本文作为异常细胞模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本文采用的内皮细胞及中膜平滑肌细胞均取自猪胸主动脉,HL-60细胞购自Gene Bank(Riken, Japan);DMEM培养基及RPMI1640培养基购自Gibco(USA);绿茶抽提物(Polyphenon100,含有多种绿茶儿茶酚类物质)、其中绿茶儿茶酚的两种主要成分是表没食子儿茶素(epigallocatechin, EGC)及表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-gallate, EGCg)均购自Kurita Co. (Japan)。

### 1.2 内皮细胞原代培养

取猪胸主动脉,两端扎紧,将血液全部清除,然后浸泡于酒精,除菌。将血管切成适度长度的小段,沿血管长轴方向将血管切开,用手术刀片垂直轻刮血管内面,轻轻地剥离内皮细胞。将剥离下来的细胞块放置于15%胎牛血清、DMEM培养液(含1%氨苄青霉素-链霉素-谷氨酸盐)中悬浮。1 000转/min、离心5 min,去上清,加入新鲜的胎牛血清1 mL,悬浮细胞。将细胞悬液与培养液分别加入培养瓶中,在37 ℃5%CO<sub>2</sub>的条件下进行培养。待细胞长满80%,传代培养,细胞数量足够多时,冻存细胞。

### 1.3 血管平滑肌细胞原代培养

本文通过外植块方法获取血管平滑肌细胞。如上所述,在刮取内皮细胞后,分别取出内膜和中膜,将中膜小心地剪成约3 mm<sup>2</sup>的小块,移植进入培养瓶

中。每培养瓶中放置约10个小的外植块,加入DMEM培养液,在37 ℃5%CO<sub>2</sub>的条件下进行培养。传代及冻存方法同内皮细胞。

### 1.4 HL60细胞培养

HL60细胞在10%胎牛血清、RPMI1640培养液培养,传代及冻存方法同上。

### 1.5 绿茶儿茶酚对内皮细胞、血管平滑肌细胞及HL60细胞增殖的影响

绿茶抽提物Polyphenon100溶液以生理盐水配制,Polyphenon100溶液的终浓度分别为20、60、200、600、2 000 μg/mL。培养好的细胞用含0.02% EDTA的PBS溶液清洗两次,加入0.2%胰酶溶液1 mL孵育5 min;待细胞脱落,加入胎牛血清混匀,中和胰酶。将细胞转移至离心管中2 000 转/min,离心5 min,移去上清;然后将细胞用培养液调整浓度至1.0×10<sup>4</sup>、2.0×10<sup>4</sup>、3.0×10<sup>4</sup> cells/mL共3个浓度。

将各浓度的细胞转移到24孔板中,每个浓度梯度的细胞分别有6个孔,每个孔里细胞体积为950 μL。然后向每孔中加入50 μL绿茶儿茶酚(Polyphenon100)溶液,使儿茶酚终浓度分别为None(+)、1、3、10、30、100 μg/mL。在None(+)中加入生理盐水作为对照,24 h后进行胰酶处理,染色,用TATAI型血细胞计数仪测量细胞数目。另外,表没食子儿茶素(EGC)及表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCg)配制方法同Polyphenon100。EGC及EGCg对多种细胞增殖影响的实验方法同上。

### 1.6 绿茶儿茶酚清除活性氧的实验

为了研究绿茶儿茶酚类物质清除活性氧的效果,本文采用次黄嘌呤-黄嘌呤氧化酶体系化学发光法来测定。次黄嘌呤和黄嘌呤氧化酶反应生成超氧阴离子自由基O<sub>2</sub><sup>-</sup>,加入化学发光探针2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimi-dazo[1,2-a]pyrazin-3-one (MCLA)。MCLA与O<sub>2</sub><sup>-</sup>反应,脱氢、脱羰基,生成物由激发态回到基态,发光波长为465 nm,由闪烁计数器或荧光计数器测定,由此计算O<sub>2</sub><sup>-</sup>的生成量<sup>[9-10]</sup>。将8 μL黄嘌呤氧化酶(10.4 U)、7 μL MCLA(1 μmol/L)、333 μL Tris-HCl(50 mmol/L)缓冲液、绿茶儿茶酚Polyphenon100溶液及适量双蒸水加入反应体系,混合2 min,最后加入次黄嘌呤100 μL(5×10<sup>5</sup> mol/L),反应体系总体积为2 000 μL。在反应体系中,绿茶儿茶酚终浓度分别为3.63、7.25、12.50、25.00 μg/mL,空白对照为双蒸水;用Luminescence Reader(Aloka, Japan)测定发光强度。

## 2 结果

### 2.1 Polyphenon100对各种细胞增殖的影响

Polyphenon100对内皮细胞增殖的影响如图1所示。在3个接种不同浓度( $1.0 \times 10^4$ 、 $2.0 \times 10^4$ 、 $3.0 \times 10^4$  cells/mL)内皮细胞情况下, 其细胞增殖趋势基本相同(结果未显示)。在Polyphenon100浓度为1  $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞增殖率略有增加; 但Polyphenon100浓度超过3  $\mu\text{g/mL}$ 后, 细胞增殖率随浓度增加而明显减少, 表明细胞的生长被较高浓度的Polyphenon100显著抑制。

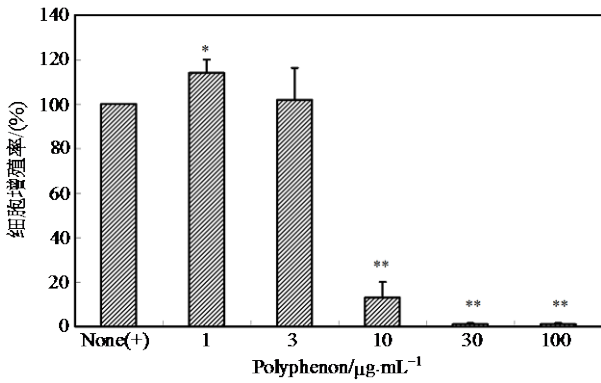


图1 Polyphenon100对内皮细胞增殖率的影响  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. None(+)

Polyphenon100对血管平滑肌细胞增殖的影响如图2所示。当Polyphenon100浓度小于3  $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞增殖率减少不明显; 当Polyphenon100浓度大于3  $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞增殖率随Polyphenon100浓度增加而显著减少。

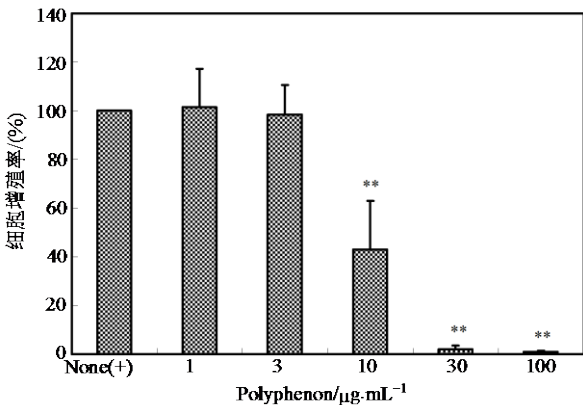


图2 Polyphenon100对血管平滑肌细胞增殖率的影响  
\*\* $P < 0.01$  vs. None(+)

Polyphenon100对HL-60细胞增殖的影响如图3所示。在加入生理盐水的情况下, 细胞数量少量地增加, 但差异无统计学意义。随着Polyphenon100浓度的增加, HL-60细胞增殖率受到明显的抑制。

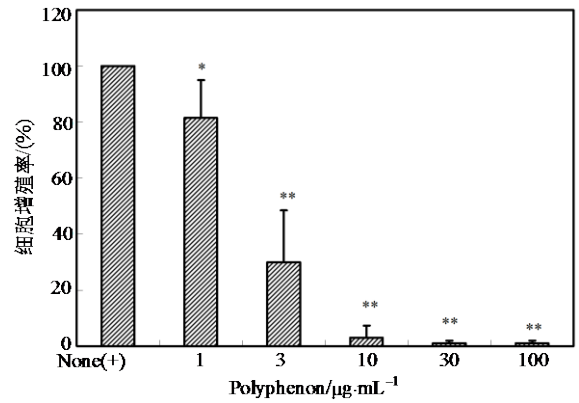


图3 Polyphenon100对HL60细胞增殖率的影响  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. None(+)

### 2.2 EGC及EGCg对各种细胞增殖的影响

EGC和EGCg是绿茶儿茶酚中的两种主要活性成份, 以下实验比较了这两种成分对各种细胞增殖的影响。EGC及EGCg对内皮细胞增殖率的影响如图4所示。EGC及EGCg对内皮细胞的增殖有很大的影响, 随着浓度的增加, 内皮细胞增殖率减少。两者相比, EGC的抑制效果更明显。

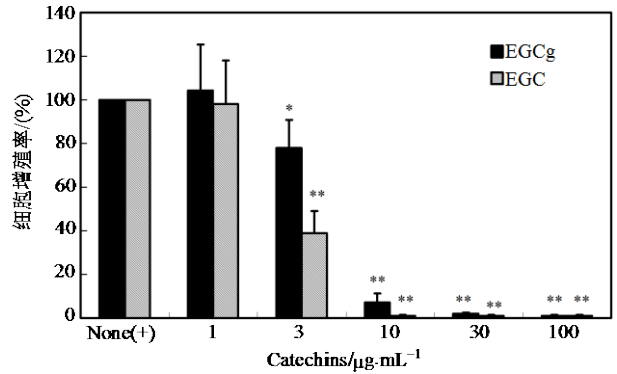


图4 EGC及EGCg对内皮细胞增殖率的影响  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. None(+)

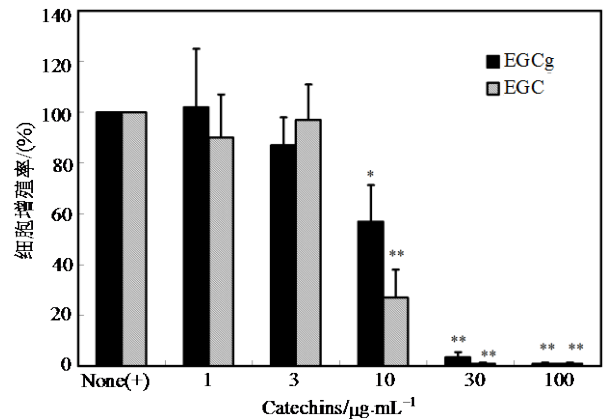


图5 EGC及EGCg对血管平滑肌细胞增殖率的影响  
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. None(+)

EGC及EGCg对血管平滑肌细胞增殖的影响如图5所示。随着EGC和EGCg的浓度增加, 血管平滑

肌细胞增殖率降低,在10  $\mu\text{g/mL}$ 浓度以上,EGC的抑制效果更明显。

EGC及EGCg对HL60细胞增殖率的影响如图6所示。低浓度的EGC及EGCg能明显抑制HL60细胞的增殖,其中EGC的抑制效果更明显。

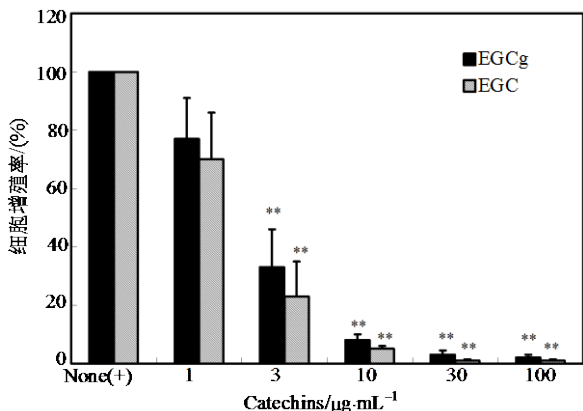


图6 EGC及EGCg对HL-60细胞增殖率的影响

\*\* $P < 0.01$  vs. None(+)

### 2.3 Polyphenon100清除活性氧的实验

将发光强度读取的数值换算成活性氧的清除率,清除率为:

$$\text{清除率}\% = [(I_0 - I_i) / I_0] \times 100\%$$

式中,  $I_0$ 为对照组发光强度值;  $I_i$ 为实验组发光强度值<sup>[10]</sup>。Polyphenon100对活性氧清除的影响如图7所示。从图7可看出, Polyphenon100浓度为3.63  $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞中生成的活性氧清除率约为18%; Polyphenon100浓度为25  $\mu\text{g/mL}$ 时,能清除细胞中生成活性氧的近70%。

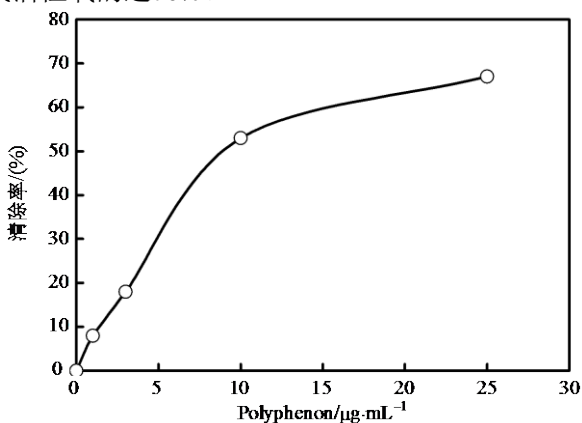


图7 Polyphenon100对活性氧清除的影响

## 3 讨论

绿茶抽提物Polyphenon100对血管平滑肌细胞增殖的影响结果表明,浓度小于或等于3  $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞增殖几乎不受影响;但大于该浓度以后,细胞增殖明显受到抑制。加入生理盐水对内皮细胞增殖

有轻微的抑制作用;但Polyphenon100浓度为1  $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞数量增殖,只是高于1  $\mu\text{g/mL}$ 这个浓度后,内皮细胞的增殖明显受到抑制。而HL-60细胞随着浓度的增加,其增殖受到更大的抑制,有明显的浓度依赖效应。

当Polyphenon100浓度为1  $\mu\text{g/mL}$ 时,内皮细胞数量增加的原因是绿茶儿茶酚有清除活性氧的功效。活性氧是好氧生物代谢过程中产生的一种副产物,是细胞老化、病变的原因之一。在内皮细胞培养的过程中添加Polyphenon100,使细胞周边乃至细胞内部的活性氧清除,细胞生存环境变好,细胞增殖,数量增加。实验和临床研究表明,儿茶酚类物质能显著地增强内皮的功能,为心血管疾病患者提供额外的好处,如EGCg能增强内皮功能,降低高血压大鼠的血压<sup>[11]</sup>。

对于血管中膜平滑肌细胞,文献[12]发现儿茶酚能抑制血管紧张素II刺激的血管平滑肌细胞增殖,通过抑制血管紧张素II活化MAPK途径和AP-1的信号通路来实现。本文的实验中, Polyphenon100浓度为1、3  $\mu\text{g/mL}$ 对血管中膜平滑肌细胞的增殖都没有明显的抑制作用,其可能的原因是血管中膜平滑肌是正常动脉的重要组成细胞,与内膜平滑肌相比,其正常的增殖没有内膜平滑肌细胞快,所以呈现不了明显的抑制效果。

文献[13]采用儿茶酚类物质处理HL-60细胞,能够抑制HL-60细胞增殖,诱导其凋亡。细胞凋亡的原因是细胞核的片段化,核片段化呈时间依赖效应。另一方面,儿茶酚类物质对正常细胞系V79-4无细胞毒性<sup>[13]</sup>。Polyphenon100对HL-60细胞增殖起抑制作用,这可能与Polyphenon100引起了细胞DNA的片段化有关。HL-60细胞是外膜平滑肌细胞的细胞模型,正常动脉几乎没有外膜平滑肌,正因为如此,HL-60细胞也被认为是一种异常的细胞模型, Polyphenon100也能抑制像HL60细胞一样的异常细胞的增殖。

EGC及EGCg对内皮细胞增殖的影响如下:3  $\mu\text{g/mL}$ 以上浓度对内皮细胞有明显的抑制作用;EGCg浓度为1  $\mu\text{g/mL}$ 时,与对照相比,增加了细胞增殖率,而EGC没有明显变化。EGCg引起内皮细胞增殖的原因与Polyphenon100的一样。

EGC及EGCg对中膜平滑肌细胞增殖的影响如下:EGCg浓度为3  $\mu\text{g/mL}$ 时,显著地抑制细胞增殖;10  $\mu\text{g/mL}$ 浓度时,EGC比EGCg的抑制率更高。

EGC及EGCg对HL-60细胞增殖的影响如下:与Polyphenon100一样,浓度越高,抑制效果越明显。

EGC及EGCg抑制HL-60细胞增殖的原因与Polyphenon100的一样,都可能是引起了细胞凋亡而导致增殖受到抑制。以上的实验主要是为了比较EGC及EGCg对细胞增殖的抑制作用的强弱。

从本文的实验结果可知, Polyphenon100清除活性氧呈浓度依赖关系,即随着Polyphenon100浓度的增加,其清除活性氧的能力也随之增加。为了降低活性氧自由基对人体的危害,除了依靠体内活性氧自由基清除系统外,还要寻找和发掘外源性活性氧自由基清除剂;利用这些物质作为替身,让它们与自由基结合,以阻断外界自由基的攻击,使人体免受伤害。

## 4 结 论

综合上述实验结果可知, Polyphenon100浓度为1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,促进内皮细胞的增殖,对正常的中膜平滑肌细胞的增殖无影响,而对于异常细胞HL-60细胞有明显的抑制增殖作用;而且,随着Polyphenon100浓度的增加,其清除活性氧的能力也增强。对于正在进行的动脉粥样硬化,绿茶儿茶酚类物质能抑制脂质的过氧化,抑制内膜平滑肌细胞的增殖,促进内皮细胞增殖以修复破坏的内皮细胞,进而对预防疾病的进一步发生具有积极的作用。

## 参 考 文 献

- [1] LUSIS A J. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000, 407: 233-241.
- [2] FALK E. Pathogenesis of atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 47: C7-12.
- [3] 金莹, 朴爱东. 植物多酚的结构及生物学活性的研究[J]. 中国食物与营养, 2005, 9: 27-29.  
JING Ying, PIAO Ai-dong. Study of the plant polyphenon structure and their biological activities[J]. Food and Nutrition in China, 2005, 9: 27-29.
- [4] JOCHMANN N, BAUMANN G, STANGL V. Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008, 11(6): 758-765.
- [5] 吕禹泽, 宋钰, 吴国宏. 葡萄多酚的抗氧化活性[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 213-216.  
LU Yu-ze, SONG Yu, WU Guo-hong. Study on the antioxidant activities of grape polyphenols[J]. Food Science, 2006, 27(12): 213-216.
- [6] De MEJIA E G, RAMIREZ-MARES M V, PUANGPRAPHANT S. Bioactive components of tea: cancer, inflammation and behavior[J]. Brain Behav Immun, 2009, 23(6): 721-731.
- [7] BABU P V, LIU D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update[J]. Curr Med Chem, 2008, 15(18): 1840-1850.
- [8] FINKEL T, HOLBROOK N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing[J]. Nature, 2000, 408 (9): 239-247.
- [9] 林金明, 屈锋, 单孝全. 活性氧测定的基本原理与方法[J]. 分析化学, 2002, 30(12): 1507-1514.  
LIN Jing-ming, QU Feng, SHAN Xiao-quan. The principles and methods of reactive oxygen species determination[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2002, 30(12): 1507-1514.
- [10] KATO M, MINAKAMI H, KUROIWA M, et al. Superoxide radical generation and mn- and Cu-zn superoxide dismutases activities in human leukemic cells[J]. Hematol Oncol, 2003, 21: 11-16.
- [11] POTENZA M A, MARASCIULO F L, TARQUINIO M, et al. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007, 292(5): E1378-1387.
- [12] WON S M, PARK Y H, KIM H J, et al. Catechins inhibit angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell proliferation via mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Exp Mol Med, 2006, 38(5): 525-534.
- [13] HAN D H, KIM J H. Difference in growth suppression and apoptosis induction of EGCG and EGC on human promyelocytic leukemia HL-60 cells[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32(4): 543-547.

编辑 黄 莘