

论 著

表没食子儿茶素没食子酸酯可改善高脂饮食大鼠胰腺组织炎症状态

暴素青^{1*}, 曹艳丽²

(¹天津市第一中心医院内分泌科, 天津 300192; ²中国医科大学附属第一医院内分泌科, 沈阳 110001)

〔摘要〕目的 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)对高脂饮食大鼠胰腺组织炎症状态的作用及其与胰岛素抵抗的关系。方法 将 30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为正常饮食组(the normal diet group as the control, NC 组, n=10)和高脂饮食组(high-fat diet group, HFD 组, n=20)。喂养 16 周, 当两组大鼠体重出现显著差异后, 将 HFD 组按随机区组原则分为单纯高脂组(high-fat diet group, HFD 组, n=10)和 EGCG 干预组(HFD+0.32% EGCG, EGCG 组, n=10); 干预 16 周。留取血清及胰腺组织, 检测每组大鼠空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、胰岛素(fasting insulin, FINS)及游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs), 并计算胰岛素抵抗指数(homeostasis model assessment-insulin resistance index, HOMA-IR); 应用免疫组织化学方法检测胰岛中 CD68⁺ 巨噬细胞数目及 TNF- α 表达; 应用 Real-time RT-PCR 及 Western blot 方法检测胰腺组织中 CD68 及 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TNF receptor-associated factor 6, TRAF6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 等炎症相关因子表达水平。结果 HFD 组大鼠体重、FFAs 和 FINS 水平与 HOMA-IR 指数均明显升高, 胰岛中巨噬细胞浸润明显增多, 胰腺 CD68 水平及 TLR4、TRAF6、TNF- α 和 IL-6 等炎症因子表达明显上升; EGCG 干预的 HFD 大鼠体重、FFAs 和 FINS 水平、HOMA-IR 指数、胰岛巨噬细胞浸润、胰腺 CD68 水平、胰腺 TNF- α 和 IL-6 表达的升高不如 HFD 大鼠明显, 与 NC 大鼠接近; 三组大鼠 FBG 水平无明显统计学差异; EGCG 干预的 HFD 大鼠 TLR4 表达水平较 HFD 组未见明显下降。结论 EGCG 可减少高脂饮食大鼠胰岛中巨噬细胞浸润, 抑制炎症因子 TNF- α 及 IL-6 表达的上调, 改善胰岛素敏感性; 该作用并非通过 TLR4 信号通路实现。

〔关键词〕EGCG; 肿瘤坏死因子- α ; 胰腺; 巨噬细胞; 胰岛素敏感性

〔中图分类号〕R589.2

〔文献标识码〕A

DOI: 10.16705/j.cnki.1004-1850.2019.02.001

Epigallocatechin gallate improves inflammation state in the pancreas of rats with a high-fat diet

Bao Suqing¹, Cao Yanli²

(¹Department of Endocrinology, Tianjin First Center Hospital; ²Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of China Medical University)

〔Abstract〕Objective To investigate the effects of epigallocatechin gallate (EGCG) on inflammation state of pancreas in rats fed a high-fat diet (HFD) and the relationship with insulin resistance. Methods 30 specific pathogen-free (SPF) male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 2 groups: the normal diet group as the control (NC group) and HFD group. When there was a significant difference in body weight between the 2 groups after 16 weeks of feeding, the HFD group was further divided into 2 subgroups: the high-fat diet group (HFD, n=10, 16 weeks) and the EGCG group (HFD + 3.2 g/kg EGCG, n=10, 16 weeks) according to the randomized block principle. After 16 weeks of intervention, the serum and pancreatic tissues were collected. Fasting blood glucose (FBG), fasting insulin (FINS), free fatty acids (FFAs) in each group were measured and homeostasis model assessment-insulin resistance

〔收稿日期〕2018-10-01 〔修回日期〕2019-02-08

〔基金项目〕国家自然科学基金资助(81000327); 中华医学会内分泌分会(12030470347)资助

〔作者简介〕暴素青, 女(1986年), 汉族, 博士, 医师

* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed): 15122146959@163.com

index (HOMA-IR) were calculated. The number of macrophage with biomarkers CD68 protein positive and the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in pancreatic tissues were evaluated by immunohistochemistry (IHC) and Western blot analysis. Meanwhile, the mRNA and proteins levels of CD68, Toll-like receptor 4 (TLR4), tumor necrosis factor receptor-related factor 6 (TRAF6), TNF- α and interleukin 6 (IL-6) in pancreatic tissue were also detected by real-time RT-PCR and Western blot. **Results** There was a significant increase in the body weight, HOMA-IR, the level of serum FFAs and FINS, the number of CD68+ macrophages in pancreas islets, and the expression of CD68, TLR4, TRAF6, TNF- α and IL-6 in pancreas, in the HFD group than those in the NC group. EGCG treatment significantly inhibited the HFD-induced increase in the number of CD68+ macrophages in pancreas islets, body weight, HOMA-IR, the levels of serum FFAs and FINS, the expression of CD68, TNF- α and IL-6 in pancreas, bringing them closer to the NC group, in addition to the expression level of TLR4. And there was no significant difference in the FBG level among the three groups. **Conclusion** In pancreas islet of rats with high-fat diet, EGCG can reduce macrophage infiltration, inhibit the up-regulation of inflammatory factors such as TNF- α and IL-6, and improve insulin sensitivity, by TLR4-independent signaling pathways.

[**Keywords**] EGCG; tumor necrosis factor- α (TNF- α); pancreas; macrophage; insulin sensitivity

近年来, 由于生活方式、饮食结构改变, 肥胖的患病率越来越高^[1]。研究表明^[2-6], 肥胖相关的胰岛素抵抗是一种慢性低度炎症性疾病, 在胰腺组织中表现为巨噬细胞浸润增加, 激活炎症信号通路, 抑制胰岛素信号通路, 随着胰岛 β 细胞破坏增多, 最终出现高血糖状态^[2-6]。在 II 型糖尿病中, 促炎细胞因子介导 β 细胞功能紊乱是糖尿病的特征性改变, 而影响 β 细胞功能的促炎因子包括 c- 反应蛋白、细胞因子 (如 IL-1 β , IL-6, TNF- α 等) 及趋化因子 (如单核细胞趋化因子 1, IL-8 等)^[7]。这些促炎因子可通过 NF- κ B 信号通路, 影响胰岛素受体底物 1 与 2 磷酸化水平, 使丝氨酸磷酸化增多, 进而影响胰岛素信号传导^[8]。

TLR4 信号通路在肥胖个体胰腺 β 细胞功能紊乱中起着重要作用, 其作为一种病原模式识别受体, 能够识别脂类、脂蛋白及一系列内源性配体 (如氧化性低密度脂蛋白等), 可介导树突细胞、巨噬细胞、脂肪组织及胰腺组织中炎症因子的产生^[9-12]。在高脂饮食者, 血循环中游离脂肪酸 (FFAs) 升高, 可激活 TLR4/myd88 信号通路, 通过释放过量趋化因子, 使胰岛中单核巨噬细胞浸润增多, 最终促进 β 细胞功能紊乱的发生^[13,14]。在 II 型糖尿病个体中, 胰岛中巨噬细胞浸润增加可直接导致 β 细胞功能紊乱的发生^[15]。

绿茶, 作为一种传统饮品, 其主要活性成分表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG) (约占绿茶儿茶素 60%), 对肥胖、糖尿病、抗动脉粥样硬化等多种疾病均具有明显的药理作用^[16,17]。在肥胖小鼠中, Dickinson 等人报道 EGCG

通过清除体内过多自由基, 恢复 DNA 修复蛋白水平, 增加抗氧化酶活性, 进而改善胰岛素信号传导及胰岛 β 细胞功能^[18]。Hara 等人报道, EGCG 能改善离体胰岛细胞存活率, 可能通过抑制 8- 羟基 -2 脱氧鸟苷的含量来实现^[19]。也可抑制脂肪酶活性, 抑制肥胖发生, 同时可增强胰岛素受体底物 2 信号, 改善胰岛素信号传导^[20]。

EGCG 是否可通过作用于 TLR4 信号通路, 改善胰腺组织炎症状态尚未见报道。因此本研究以高脂饲料喂养建立肥胖大鼠动物模型, 观察 EGCG 对胰腺组织 TLR4 炎症信号通路是否存在调节作用, 并探讨相关机制。

材料与方法

1 主要试剂

小鼠单克隆抗体 TLR4 及 CD68 购自 Abcam 公司; 山羊多克隆抗体 TNF- α 、IL-6 及 β -actin 均购自 Santa Cruz 公司; 兔抗山羊免疫球蛋白 G (IgG) 及兔抗小鼠免疫球蛋白 G (IgG) 均购自北京中杉公司; 全蛋白提取试剂盒购自凯基公司; RNA 稳定剂 (RNAlater) 购于 QIAGEN 公司; Trizol, cDNA 反转录试剂盒及 SYBR Select Master Mix 均购于 Invitrogen 公司; 引物由 TaKaRa (大连宝生物公司) 设计并合成; 免疫组织化学试剂盒购自迈新公司; 胰岛素测定碘 (I^{125}) 放免试剂盒购自北京原子高科公司; 游离脂肪酸测定采用酶法; EGCG (纯度 $\geq 98\%$) 购于 Cayman 公司。

2 肥胖大鼠模型建立与实验分组

SPF 级健康 4w 龄雄性 SD 大鼠 30 只, 体重

85~108 克, 购自北京华阜康动物饲养公司。实验前适应性喂养 1w 后, 随机分为正常饮食组 (normal diet, NC, n=10) 和高脂饮食组 (high-fat diet, HFD, n=20)。大鼠饲养于中国医科大学动物饲养中心, 每笼 5 只, 温度控制在 (22±2) °C, 湿度控制在 55%~60%, 明暗交替周期为 12h。所用饲料由实验动物中心提供。喂养期间自由摄食和饮水, 每周固定时间称重, 记录大鼠生长曲线。喂养 16w 后, 普食组 (NC) 和高脂饮食组 (HFD) 大鼠体重出现明显差异, 开始进入 EGCG 干预阶段。此实验的所有过程均按照国家卫生研究所实验动物使用规章进行。

肥胖模型建立后, 将 HFD 组大鼠按照随机区组原则分为两组: 单纯高脂饮食组 (HFD, n=10) 和含 0.32% EGCG (相当于每 200ml 杯中含 2g 茶叶, 共 10 杯) 的高脂饮食组 (HFD+EGCG, n=10), 余喂养条件不变。每周监测大鼠体重及摄食量。干预 16 周。

3 标本采集及测定

大鼠禁食 14h, 称重, 10% 水合氯醛 (0.35ml/100g) 腹腔注射麻醉, 心尖取血, 立即 4°C 低温下 3000r/min 离心 10min, 分离血清置 -80°C 冰箱冻存备用。迅速取出胰腺组织, 剔除血管及其他结缔组织。分两部分处理: ①将组织切为长宽高均 ≤0.5cm, 放于 RNA 稳定剂 (RNA later) 中, 为下一步 Real-time RT-PCR 做准备; ②另一部分置于冻存管后放入液氮中, 过夜后移至 -80°C 冰箱中冻存备用。

4 生物化学分析

尾静脉采血罗氏血糖仪测定 3 组大鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG); 碘 (I¹²⁵) 放免试剂盒测定基础胰岛素水平 (fasting serum insulin, FINS), 并计算胰岛素抵抗指数 (homeostasis model assessment-insulin resistance index, HOMA-IR index): $HOMA-IR = FBG (mmol/l) \times FINS (mU/l) / 22.5$; 采用酶法测定血清中游离脂肪酸 (free fatty acids, FFAs) 水平。

5 免疫组织化学

选取适当大小的胰腺组织放于冰冻切片机 (Leica CM3050 S) 组织托上, 用 OCT 包埋, 切片厚度约 6μm, 粘片, 于 4° 丙酮中固定 10min, 0.01 mol/L PBS 冲洗 3 次 ×5min, 3% H₂O₂ 淬灭内源性过氧化物酶 10min, PBS 冲洗 3 次, 加一抗 (CD68:

1:200; TNF-α: 1:100) 4°C 过夜, PBS 冲洗 3 次, 血清封闭 10min, 相应种属生物素化的二抗室温孵育 30min, PBS 冲洗 3 次, 加链霉素亲和素-过氧化物酶复合体室温孵育 10min。PBS 冲洗 3 次, DAB 显色 1min (镜下观察确定显色时间), 苏木素复染, 酒精脱水、苯化, 中性树胶封片。显微镜下观察, 利用 Image-Pro Plus 5.0 软件进行 IOD 值分析。

6 巨噬细胞浸润评估

采用 CD68 免疫组织化学染色标记胰腺组织中巨噬细胞, 每组随机选取 10 张不同的切片于显微镜下观察 (×40 高倍视野)、记数并统计分析。

7 Real-time RT-PCR 检测胰腺中炎症因子表达水平

称取 100mg 胰腺组织, 剪碎并充分匀浆, 采用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 说明书抽提总 RNA, 应用 Tecan infinite M200 多功能酶标仪测定 RNA 纯度 (纯度在 1.8~2.0) 及浓度, 取 RNA 200ng 进行逆转录 (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Invitrogen 公司)。

目的基因和内参 (GAPDH) 的引物序列由 Takara 公司设计并合成, 序列见表 1。按照 SYBR[®] Select Master Mix 试剂盒 (Life technology 公司) 说明书, 采用 Light Cycler 480 荧光定量 PCR 仪进行实时定量 PCR 反应。反应体系 20μl, 反应条件 50°C 2min 预变性, 95°C 2min 变性, 95°C 15s, 60°C 1min, 40 循环。结果通过 LightCycler480 1.5 软件分析。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences used in real-time PCR analysis

Genes	Primer sequences
TLR4	Forward: 5'-CCGCTCTGGCATCATCTTCA-3'
	Reverse: 5'-CCCACTCGAGGTAGGTGTTTCTG-3'
TRAF6	Forward: 5'-TCTCCCCTGCCTTCATTGTT-3'
	Reverse: 5'-AGGCTGGCGATTTTGTGTTT-3'
TNF-α	Forward: 5'-GGCGTGTCATCCGTTCTC-3'
	Reverse: 5'-CTTCAGCGTCTCGTGTGTTTCT-3'
GAPDH	Forward: 5'-GCAAGTTCAACGGCACAG-3'
	Reverse: 5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'

8 Western blot 检测胰腺中炎症因子蛋白水平

剪取约 100mg 胰腺组织依次加入适量的裂解液、磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂及 PMSF (KGP 250 kit), 匀浆 (8min), 匀浆后置于冰浴中 30min,

10000r/min 离心 30min, 取管底清液, BCA 法测定蛋白浓度, 定量, 加入等体的 SDS-PAGE 样品缓冲液, 于 100℃煮沸 5min, 放于 -20℃保存备用。

待所有样品获得后加样进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 其后转移至 PVDF 膜, 用 TBST 洗膜 (5min×3), 用含 5% BSA TBST 缓冲液室温封闭 1h, 加一抗 4℃过夜孵育, 洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1h, 洗膜, 用增强型化学发光法 (ECL) 显色, 成像检测系统 (AlphaView 1.3) 成像, Image-pro Plus 6.0 (IPP 6.0) 图像处理软件定量分析, 以目的蛋白条带光密度与内参蛋白 (β -actin) 条带光密度比值作为目的蛋白相对水平。

9 统计学处理

所有统计资料用 SPSS 17.0 软件进行统计学分

析。数据进行正态性检验后以 \pm SD 表示。组间差异比较采用单因素 ANOVA 方法分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1 EGCG 改善高脂饮食大鼠糖代谢异常

为了评估 EGCG 对机体代谢改变, 我们检测了 EGCG 处理对大鼠体重、FFAs、FBG、FINS 和 HOMA-IR 指数及摄食量的影响。结果显示, HFD 组大鼠体重、FFAs、FINS 和 HOMA-IR 指数均明显高于 NC 组; EGCG 处理的 HFD 大鼠, 体重、FFAs、FINS 和 HOMA-IR 指数显著低于 HFD 大鼠, 与 NC 大鼠相近; 三组大鼠 FBG 水平无明显统计学差异 (表 2)。

表 2 EGCG 对大鼠代谢相关指标的影响

Tab. 2 Effects of EGCG on metabolic related factors in rats

Group type	Body weight 1 (g)	Body weight 2 (g)	FFAs (mmol/L)	FINS (mIU/L)	FBG (mmol/L)	Food intake (g/week)	HOMA-IR
NC	467±8	567±7	0.35±0.12	16.4±0.8	4.86±0.25	149±9	3.53±0.15
HFD	515±6*	621±21*	0.83±0.14*	29.6±2.4*	4.93±0.48	139±14	6.49±0.79*
EGCG	517±7*	587±14	0.36±0.15#	15.7±1.9#	4.84±0.49	134±11	3.38±0.41#

Body weight 1, body weight before intervention; Body weight 2, body weight after intervention; *, $0.01 < P < 0.05$, HFD vs NC; #, $0.01 < P < 0.05$, EGCG vs HFD; n=10

2 EGCG 减轻高脂饮食大鼠胰岛中炎症状态

免疫组织化学检测显示: 与 NC 组相比, HFD 组胰岛中巨噬细胞浸润明显增多, 而 EGCG 组巨噬细胞浸润较 HFD 组明显减少, 略多于 NC 组, 且与 NC 组比较无显著性差异 (图 1A, 图 1B)。对 CD68 水平的 Western blot 分析发现, HFD 大鼠胰腺 CD68 水平明显上调, 而 EGCG 处理的 HFD 大鼠 CD68 水平明显低于 HFD 大鼠, 约为 HFD 组 64.5%, 略高于 NC 组, 与 NC 组比较无显著性差异 (图 1C)。

对胰腺 TNF- α 进行免疫组织化学和 Western blot 检测显示, HFD 组 TNF- α 免疫反应性明显增强, 约为 NC 组的 4 倍, 而 EGCG 干预组的 TNF- α 免疫反应性明显低于 HFD 组, 约为 HFD 组的 40% (图 2)。上述结果表明, EGCG 能明显抑制胰岛炎症发生, 降低炎症细胞因子 TNF- α 水平。

3 EGCG 抑制高脂饮食大鼠胰腺 TNF- α 和 IL-6 表达的上调

为了进一步评估 EGCG 对炎症状态的作用,

我们检测了胰腺中炎症相关因子 TLR4、TRAF6、TNF- α 及 IL-6 表达。高脂饮食大鼠胰腺中 TLR4、TRAF6、TNF- α 及 IL-6 mRNA 水平明显升高, 分别约为对照组的 1.4 倍、1.3 倍、2.2 倍及 4.5 倍 (图 3)。EGCG 处理的 HFD 大鼠胰腺中 TNF- α mRNA 及蛋白水平较 HFD 大鼠均明显下降, 分别约为 HFD 组的 59.5% (图 3) 及 65.3% (图 4); EGCG 处理的 HFD 大鼠胰腺中 IL-6 mRNA 及蛋白水平较 HFD 大鼠亦明显下降, 分别为 HFD 组的 20.5% (图 3) 及 69.5% (图 4); 而 EGCG 处理的 HFD 大鼠胰腺中 TLR4 和 TRAF6 mRNA 及蛋白水平较 HFD 组未见明显下降 (图 3, 图 4)。

讨 论

本研究中, 我们探讨了 EGCG 对高脂饮食所致胰腺组织炎症状态的作用机制。研究结果表明, EGCG 干预能抑制高脂饮食大鼠胰岛中巨噬细胞浸润和胰腺组织中 TNF- α 及 IL-6 表达的上调, 这种抑

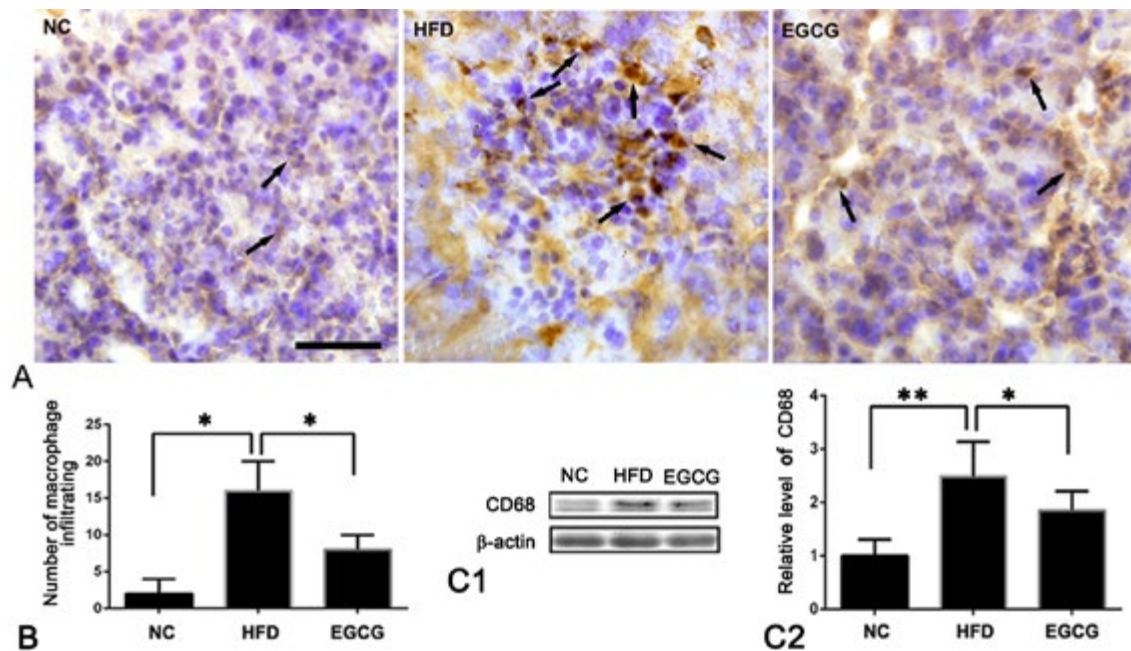


图 1 EGCG 对高脂饮食大鼠胰岛中巨噬细胞浸润和 CD68 水平的影响。A, CD68 免疫组织化学染色标记巨噬细胞 (箭头), 以苏木精复染核; 比例尺, 50 μ m; B, 胰岛中每高倍视野中巨噬细胞浸润数量统计学分析; C1, 胰腺 CD68 水平 Western blot 检测; C2, 胰腺 CD68 水平统计学分析 (正常组标准化为 1); **, $P < 0.01$; *, $0.01 < P < 0.05$; $n=9$

Fig. 1 Effect of EGCG on infiltration of macrophage and CD68 level in the pancreas islets of the rats with high-fat diet. A, macrophages were labelled by CD68 with immunohistochemical staining (arrows), nuclei were counterstained with hematoxylin; scale bar, 50 μ m; B, statistical analysis for the numbers of macrophages infiltrating into the pancreas islets per high power field; C1, Western blotting for the level of CD68 in the pancreas; C2, statistical analysis for the level of CD68 (the level of NC group was normalized as 1); **, $P < 0.01$; *, $0.01 < P < 0.05$; $n=9$

制炎症的作用并非通过降低 TLR4 信号通路活性来实现。

EGCG 是绿茶中主要活性成分。作为一种抗氧化剂, 其可受到某些环境因素如 pH 值、温度、自由基水平等影响^[21]。大鼠口服摄入 EGCG 后, 进行甲基化、醛糖酸化及硫酸盐化反应, 其 EGCG 代谢产物以上述形式存在, 其中酚羟基含量决定 EGCG 及其代谢产物抗菌、抗动脉硬化及抗肿瘤活性^[22]。

近年来, 越来越多的研究集中在 EGCG 与肥胖方面^[23-25]。在本项研究中, EGCG 对高脂饮食大鼠表现出一定的抑制体重增加作用, 降低血清中 FFAs 水平, 而摄食量并未见明显改变, 这些与既往一些研究报道相一致^[26-27]。而基础血糖水平三组之间未见明显统计学差异, 此与既往报道不一致^[28], 我们推测可能与饮食结构、种属 (大鼠与小鼠) 及摄取方式有关。EGCG 干预可改善高脂大鼠 HOMA-IR 值, 表明其可改善胰岛素敏感性, 增加机体对外源性葡萄糖的代谢能力^[29]。

在胰岛细胞中, 由于循环中高水平的 FFAs 刺激炎症趋化因子 (如单核细胞趋化蛋白 -1, 趋化因

子配体 -2 及 IL-8 等) 表达增多, 进而募集巨噬细胞浸润增加, 这些炎症状态可使胰岛 β 细胞功能紊乱^[9,13,15]。EGCG 能够逆转高糖环境中胰岛素的释放, 抑制核因子 - κ B (NF- κ B) 活性, 进而保护胰岛细胞免受炎症因子 (IL-1 β , TNF- α 及 IL-6 等) 所致的功能紊乱发生^[30-32]。同时 EGCG 能升高循环中 IL-10 水平, 改善葡萄糖耐量, 降低糖化血红蛋白水平, 进而延缓 1 型糖尿病的发生^[33]。在本研究中, 我们发现 EGCG 可减少高脂饮食所致肥胖大鼠胰岛中巨噬细胞浸润, 抑制炎症因子如 TNF- α 及 IL-6 的表达, 进一步提示 EGCG 减轻胰腺组织炎症的同时, 能改善机体胰岛素敏感性。

TLR4 作为一种重要的模式分子识别受体, 能够识别多种病原相关分子, 如脂多糖 (LPS), 多肽及类脂 (尤其是饱和脂肪酸) 等, 激活代谢相关炎症反应的发生^[34-36]。其主要通过激活 TLR4/MyD88 信号通路介导趋化因子的产生及增加巨噬细胞浸润程度^[15]。FetA, 一种肝源性的糖蛋白, 可作为衔接蛋白协助 FFAs 激活 TLR4^[37]。本研究中, 高脂饮食明显增加 TLR4 水平, 这与既往研究报道相

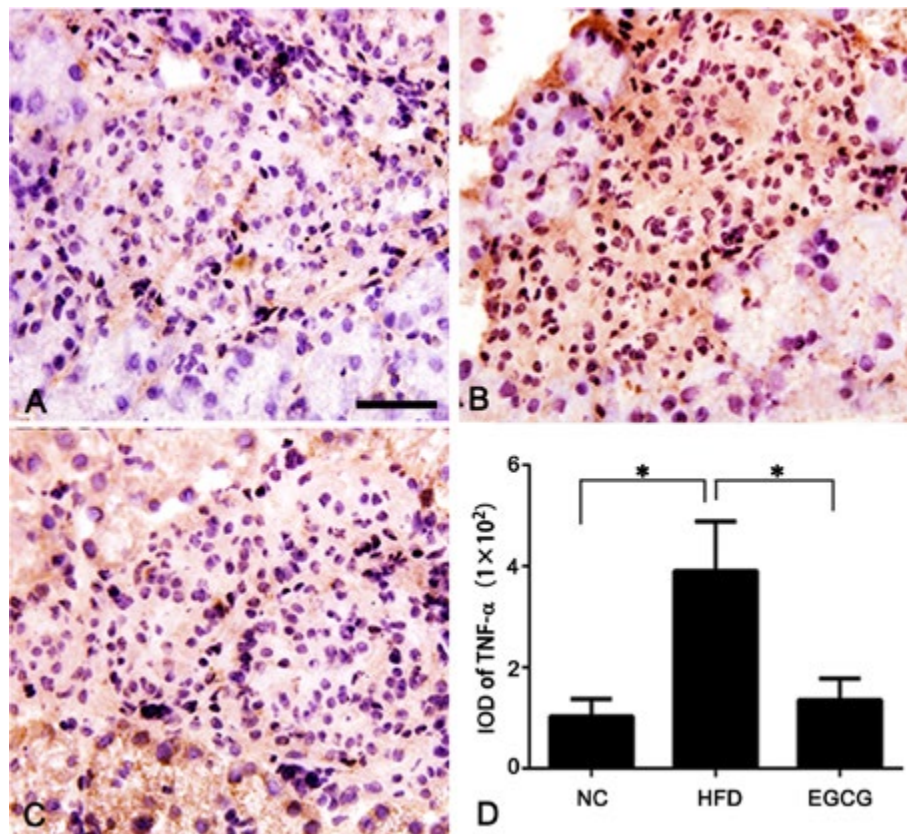


图2 EGCG对高脂饮食大鼠胰岛中TNF- α 水平的影响。A-C, 胰腺TNF- α 免疫组织化学染色(比例尺, 50 μ m); A, NC组; B, HFD组; C, EGCG组; D, TNF- α 免疫反应性统计学分析(正常组标准化为1); *, 0.01 < P < 0.05; n=9

Fig. 2 Effect of EGCG on levels of TNF- α in the pancreas islets of the rats with high-fat diet. A to C, immunohistochemical staining of TNF- α in pancreas (scale bar, 50 μ m); A, NC group; B, HFD group; C, EGCG group; D, statistical analysis for the immunoreactivity of TNF- α (the level of NC group was normalized as 1); *, 0.01 < P < 0.05; n=9

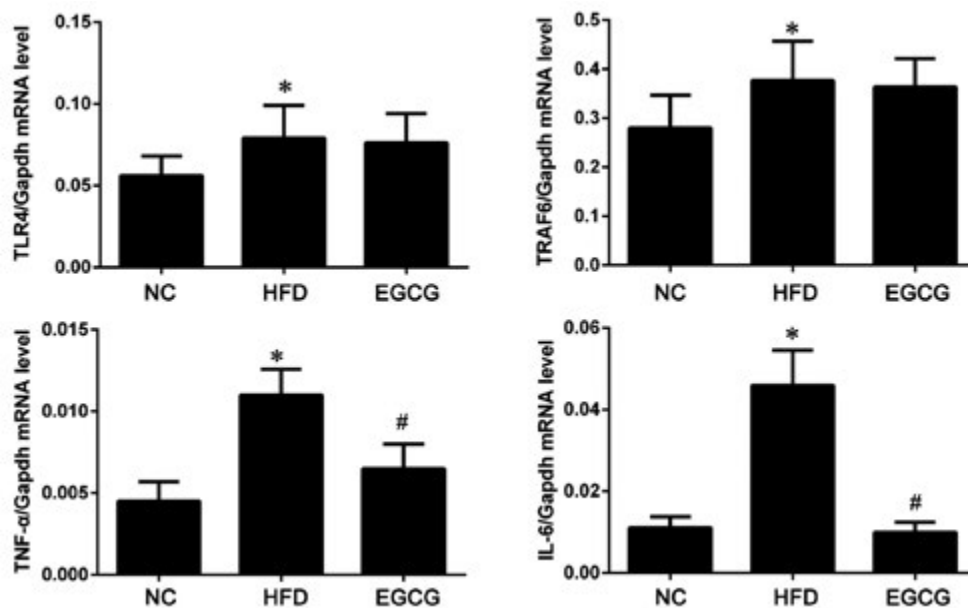


图3 EGCG对高脂饮食大鼠胰腺中TLR4、TRAF6、TNF- α 及IL-6 mRNA表达影响的实时定量PCR检测。*, 0.01 < P < 0.05 vs NC组; #, 0.01 < P < 0.05 vs HFD组; n=9

Fig. 3 Real-time quantitative PCR detection for effect of EGCG on mRNA expression of TLR4, TRAF6, TNF- α and IL-6 in the pancreas of the rats with high-fat diet. *, 0.01 < P < 0.05 vs NC group; #, 0.01 < P < 0.05 vs HFD group; n=9

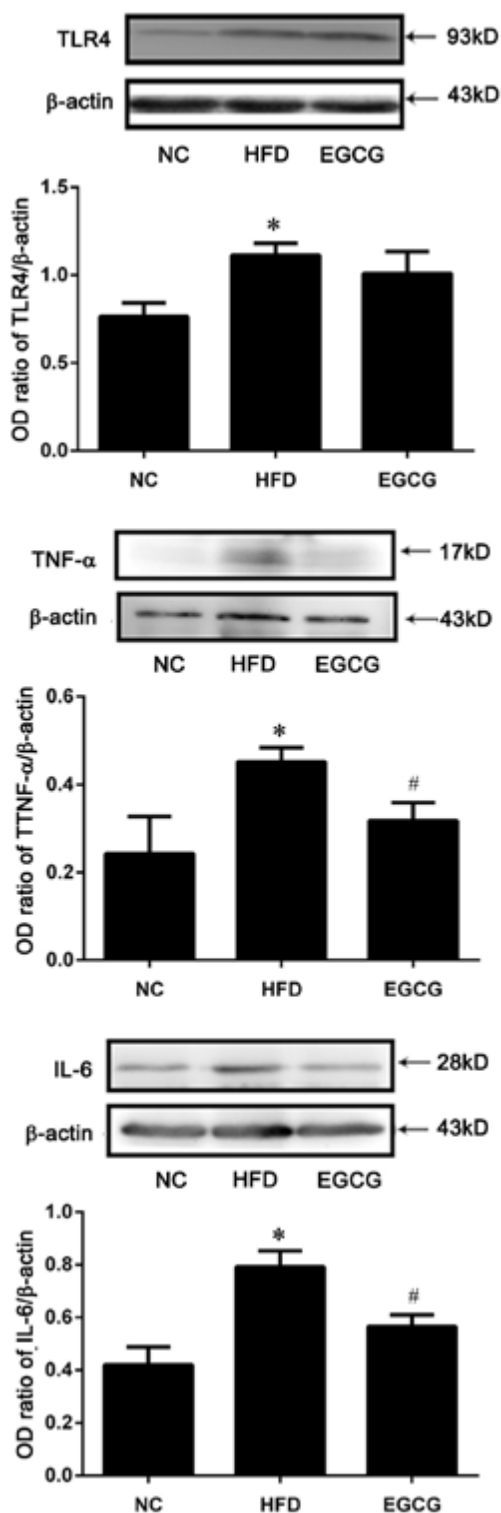


图4 EGCG对高脂饮食大鼠胰腺中TLR4、TNF- α 及IL-6表达影响的Western blot检测。*, $0.01 < P < 0.05$ vs NC组; #, $0.01 < P < 0.05$ vs HFD组; n=9

Fig. 4 Western blotting detection for effect of EGCG on protein expression of TLR4, TNF- α and IL-6 in the pancreas of the rats with high-fat diet. *, $0.01 < P < 0.05$ vs NC group; #, $0.01 < P < 0.05$ vs HFD group; n=9

一致, 而EGCG干预并没有明显抑制TLR4表达上调, 这与既往研究报道不一致^[38]。我们推测对TLR4信号通路作用可能存在剂量依赖性, 或是EGCG可能通过作用于其它途径(如信号传导与转录活化因子(STAT), 过氧化物酶体增殖子活化受体(PPAR), 或核因子 κ B(NF- κ B)等)改善胰腺组织炎症状态^[39]。因此, EGCG对胰腺组织中TLR4信号通路的影响尚需进一步研究。

这项研究尚存在一些局限性, 如仅利用单一的EGCG剂量来探索其对胰腺组织中TLR4信号通路的影响, EGCG作用可能存在剂量依赖性。而EGCG喂养组大鼠血清中EGCG浓度未进行测定, EGCG生物利用度未知, 这些均可能影响本研究结果。

综上, 本研究表明EGCG可改善高脂大鼠胰腺组织中炎症状态, 减轻胰岛中巨噬细胞浸润, 阻止胰腺 β 细胞功能紊乱发生, 增加胰岛素敏感性。这些结果为EGCG抗炎活性分子学机制提供了一个新视角, 未来还需要进一步研究来探讨不同剂量的EGCG对胰岛 β 细胞的功能的作用。

参考文献

- [1] Kramer CK, Zinman B, Retnakaran R. Are metabolically healthy overweight and obesity benign conditions? a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, 2013, 159(11): 758-769.
- [2] Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 2006, 444(7121): 860-867.
- [3] Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*, 2008, 118(9): 2992-3002.
- [4] Grant RW, Dixit VD. Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front Immunol*, 2013, 4: 50.
- [5] Gupta D, Krueger CB, Lastra G. Over-nutrition. Obesity and insulin resistance in the development of β -cell dysfunction. *Curr Diabetes Rev*, 2012, 8(2): 76-83.
- [6] Montane J, Cadavez L, Novials A. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2014, 7: 25-34.
- [7] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55(8):

- 1139–1149.
- [8] Odegaard JI, Chawla A. Connecting type 1 and type 2 diabetes through innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(3): a007724.
- [9] Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*, 2009, 21(4): 317–337.
- [10] Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, et al. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, 2006, 116(11): 3015–3025.
- [11] Youssef-Elabd EM, McGee KC, Tripathi G, et al. Acute and chronic saturated fatty acid treatment as a key instigator of the TLR-mediated inflammatory response in human adipose tissue, in vitro. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(1): 39–50.
- [12] Tian YF, He CT, Chen YT, et al. Lipoic acid suppresses portal endotoxemia-induced steatohepatitis and pancreatic inflammation in rats. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(18): 2761–2771.
- [13] Eguchi K, Manabe I, Oishi-Tanaka Y, et al. Saturated fatty acid and TLR signaling link β -cell dysfunction and islet inflammation. *Cell Metab*, 2012, 15(4): 518–533.
- [14] Lee JY, Sohn KH, Rhee SH, et al. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*, 2001, 276(20): 16683–16689.
- [15] Richardson SJ, Willcox A, Bone AJ, et al. Islet-associated macrophages in type 2 diabetes. *Diabetologia*, 2009, 52(8): 1686–1688.
- [16] Mangine GT, Gonzalez AM, Wells AJ, et al. The effect of a dietary supplement (N-oleyl-phosphatidyl-ethanolamine and epigallocatechin gallate) on dietary compliance and body fat loss in adults who are overweight: a double-blind, randomized control trial. *Lipids Health Dis*, 2012, 11: 127.
- [17] Wolfram S, Wang Y, Thielecke F. Anti-obesity effects of green tea: from bedside to bench. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50(2): 176–187.
- [18] Dickinson D, Derossi S, Yu H, et al. Epigallocatechin-3-gallate modulates anti-oxidant defense enzyme expression in murine submandibular and pancreatic exocrine gland cells and human HSG cells. *Autoimmunity*, 2014, 47(3): 177–184.
- [19] Hara Y, Fujino M, Takeuchi M, et al. Green-tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate provides resistance to apoptosis in isolated islets. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2007, 14(5): 493–497.
- [20] Cha KH, Song DG, Kim SM, et al. Inhibition of gastrointestinal lipolysis by green tea, coffee, and gomchui (*Ligularia fischeri*) tea polyphenols during simulated digestion. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(29): 7152–7157.
- [21] Sang S, Yang I, Buckley B, et al. Autoxidative quinone formation in vitro and metabolite formation in vivo from tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate: studied by real-time mass spectrometry combined with tandem mass ion mapping. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(3): 362–371.
- [22] Kida K, Suzuki M, Matsumoto N, et al. Identification of biliary metabolites of (-)-epigallocatechin gallate in rats. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(9): 4151–4155.
- [23] Wang S, Moustaid-Moussa N, Chen L, et al. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(1): 1–18.
- [24] Maki KC, Reeves MS, Farmer M, et al. Green tea catechin consumption enhances exercise-induced abdominal fat loss in overweight and obese adults. *J Nutr*, 2009, 139(2): 264–270.
- [25] Bogdanski P, Suliburska J, Szulinska M, et al. Green tea extract reduces blood pressure, inflammatory biomarkers, and oxidative stress and improves parameters associated with insulin resistance in obese, hypertensive patients. *Nutr Res*, 2012, 32(6): 421–427.
- [26] Klaus S, Pültz S, Thöne-Reineke C, et al. Epigallocatechin-gallate attenuates diet-induced obesity in mice by decreasing energy absorption and increasing fat oxidation. *Int J Obes (Lond)*, 2005, 29(6): 615–623.
- [27] Chen YK, Cheung C, Reuhl KR, et al. Effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on newly developed high-fat/Western-style diet-induced obesity and metabolic syndrome in mice. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(21): 11862–11871.
- [28] Mlinar B, Marc J, Janez A, et al. Molecular mechanisms of insulin resistance and associated diseases. *Clin Chim Acta*, 2007, 375(1-2): 20–35.
- [29] Geloneze B, Tambascia MA. Laboratorial evaluation and diagnosis of insulin resistance. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2006, 50(2): 208–215.
- [30] Pavan Kumar P, Radhika G, Rao GV, et al. Interferon γ and glycemic status in diabetes associated with chronic pancreatitis. *Pancreatol*, 2012, 12(1): 65–70.
- [31] Zhang Z, Ding Y, Dai X, et al. Epigallocatechin-3-gallate protects pro-inflammatory cytokine induced injuries in insulin-producing cells through the mitochondrial pathway. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(1): 311–316.
- [32] Han MK. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage. *Exp Mol Med*, 2003, 35(2): 136–139.
- [33] Fu Z, Zhen W, Yuskavage J, et al. Epigallocatechin gallate de-

- lays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese-diabetic mice. *Br J Nutr*, 2011, 105(8): 1218–1225.
- [34] Poggi M, Bastelica D, Gual P, et al. C3H/HeJ mice carrying a toll-like receptor 4 mutation are protected against the development of insulin resistance in white adipose tissue in response to a high-fat diet. *Diabetologia*, 2007, 50(6): 1267–1276.
- [35] Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 2007, 56(8): 1986–1998.
- [36] Kim F, Pham M, Luttrell I, et al. Toll-like receptor-4 mediates vascular inflammation and insulin resistance in diet-induced obesity. *Circ Res*, 2007, 100(11): 1589–1596.
- [37] Pal D, Dasgupta S, Kundu R, et al. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med*, 2012, 18(8): 1279–1285.
- [38] Bao S, Cao Y, Fan C, et al. Epigallocatechingallate improves insulin signaling by decreasing toll-like receptor 4 (TLR4) activity in adipose tissues of high-fat diet rats. *Mol Nutr Food Res*, 2014, 58(4): 677–686.
- [39] Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72: 219–246.