

[文章编号] 1007-3949(2009)17-04-0281-04

• 实验研究 •

大鼠缺血性心肌损伤后早期抑制核因子 κ B 对心肌修复的影响

潘波¹, 杨成明¹, 曾春雨¹, 熊秀勤², 王旭开¹, 王红勇¹

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所 1 心血管内科, 2 超声诊断科, 重庆市 400042)

[关键词] 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐; 核因子 κ B; 异丙肾上腺素; 大鼠; 心肌缺血性损伤; 心肌修复

[摘要] 目的 研究大鼠缺血性心肌损伤后早期抑制核因子 κ B 对心肌修复及心功能的影响。方法 应用大剂量异丙肾上腺素建立大鼠缺血性心肌损伤模型, 造模后 24 h 存活的大鼠随机分为实验组和治疗组, 并设立对照组。治疗组给予大鼠腹腔注射 100 mg/kg 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐, 每日 1 次, 连续 26 d。检查心肌病理形态学、心肌核因子 κ B 激活情况、心肌毛细血管密度及肌纤维母细胞浸润情况, 并在实验第 14、28 天进行超声心动图检查观察心脏结构及心功能变化情况。结果 实验组与治疗组心肌坏死面积无明显差异; 应用吡咯烷二硫代氨基甲酸盐有效抑制了缺血性心肌损伤后心肌核因子 κ B 的激活, 并导致肉芽组织替代受损心肌组织延迟, 心肌坏死边缘区毛细血管密度减低及心肌坏死区肌纤维母细胞浸润受抑制; 治疗组室壁瘤的发生较实验组明显增加, 实验第 28 天, 治疗组心功能降低较实验组更为明显。结论 大鼠缺血性心肌损伤后早期抑制核因子 κ B 可能对心肌修复不利, 并进而对心室重塑、心功能造成不良影响。

[中图分类号] R332

[文献标识码] A

Effects of Inhibition of Nuclear Factor- κ B in the Early Phase After Myocardial Ischemia on Myocardial Reparation in Rats

PAN Bo¹, YANG Cheng-Ming¹, ZENG Chun-Yu¹, XIONG Xiu-Qin², WANG Xu-Kai¹, and WANG Hong-Yong¹

(1 Department of Cardiology, 2 Department of Ultrasonic Diagnosis, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[KEY WORDS] Pyrrolidine Dithiocarbamate; Nuclear Factor- κ B; Isoprenaline; Rats; Myocardial Ischemic Injury; Myocardial Reparation

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of inhibition of NF- κ B in the early phase after myocardial ischemia on myocardial reparation in rats. **Methods** The myocardial ischemic injury models were established by hypodermic injection of high dose of ISO in rats. Surviving rats were randomly divided into experimental group and treated group, meanwhile control group was set. Then treated group was injected PDTC 100 mg/(kg·d) for 26 days. Myocardial pathomorphologic changes, NF- κ Bp65 activation, capillary density and myofibroblast accumulation were investigated. Then cardiac structure and function were assessed by echocardiography on day 14 and 28 of experiment. **Results** Cardiac necrotic areas were similar between experimental group and treated group. PDTC inhibited the activation of myocardial NF- κ B, delayed the replacement of the damaged myocardium with granulation tissue, significantly depressed capillary density in the border area of necrosis and decreased myofibroblast accumulation in the zone of necrosis. The ratio of ventricular aneurysm formation in treated group was higher than experimental group. On day 28, the left ventricular functions in treated group were worse than that in experimental group. **Conclusion** Inhibition of NF- κ B in the early phase after experimental myocardial ischemic injury in rats may be adverse to myocardial reparation, and may aggravate heart failure.

核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是细胞中一个重要的转录调节因子。研究证实, 细胞内外的许多刺激信号都能激活 NF- κ B, 激活的 NF- κ B 能启动多种活性物质包括相应细胞因子、粘附分子、炎性递质等物质的基因转录, 引起细胞和组织损

伤。抑制 NF- κ B 能够减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤; Gupta 等^[1]报道, 抑制 NF- κ B 还能够减轻自发性高血压大鼠的心室重塑。作者前期的研究也发现, 预防性应用 NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 能够减轻异丙肾上腺素 (Isoprenaline, ISO) 所致大鼠缺血性心肌损伤, 并对其后的心室扩大、心衰起到一定防治作用; 但同时作者也观察到抑制 NF- κ B 后肉芽组织替代受损心肌组织延迟^[2]。为此, 本实验进一步研究大鼠缺血性心肌损伤后早期抑制 NF- κ B 对心肌修复及心功能的影响。

[收稿日期] 2009-02-17 [修回日期] 2009-03-25

[作者简介] 潘波, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事冠心病研究, 联系电话为 023-68757810, Email 为 pb1240@sina.com。通讯作者杨成明, 硕士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化、冠心病心衰方面的研究, 联系电话为 023-68757801, Email 为 yangcm@163.com。曾春雨, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事高血压发病机制方面的研究, 联系电话为 023-68757808, Email 为 chunyu2001@163.com。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

ISO 购自济南科汇医药公司; PDTC 购自 sigma 公司; 兔抗人 NF- κ Bp65 多克隆抗体购自武汉博士德公司; 鼠抗人 α 平滑肌动蛋白单克隆抗体、鼠抗人 CD31 单克隆抗体及免疫组化 PV-6001、PV-6002 二步法检测试剂购自北京中杉公司。

1.2 大鼠心肌损伤模型的建立及分组

由第三军医大学附属大坪医院实验动物中心提供, 体重为 200 ± 20 g 的雄性成年 Wistar 大鼠建立缺血性心肌损伤模型, 造模方法参考文献 [3]。以 170 mg/kg ISO 皮下注射, 24 h 后重复 1 次。末次给药后 24 h 存活的大鼠 30 只随机分为实验组和治疗组, 每组 15 只。其中实验组经腹腔注射生理盐水 0.6 mL, 每日 1 次, 连续 26 d; 治疗组经腹腔注射 100 mg/kg PDTC, 每日 1 次, 连续 26 d。另设对照组大鼠 15 只, 用相同容量的生理盐水代替 ISO 进行皮下注射。在实验第 7、14 天每组中随机抽取 4 只大鼠在腹腔给药后 12 h 处死留取标本进行相关检测, 实验第 28 天处死所有剩余大鼠。

1.3 超声心动图检查

实验第 14 和 28 天在腹腔给药后 12 h 对所有大鼠进行超声心动图检查。将大鼠以 40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 仰卧位固定四肢和头部。用 ACUSON sequoia 512 超声显像仪, 探头频率 14 MHz 测量大鼠左室长轴二维图像和左室乳头肌水平 M 型超声, 计算机自动计算左室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD), 左室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic dimension, LVESD), 射血分数 (ejection fraction, EF), 测定值均为 5 个心动周期测定的均值。

1.4 心肌病理形态学检查

大鼠活杀后开胸取心脏, 拍照后取心尖部心肌, 以 4°C 冷生理盐水冲洗干净后用 4% 多聚甲醛溶液固定。组织固定 48 h 后常规脱水、石蜡包埋, $4\ \mu\text{m}$ 间断连续切片, HE 染色, 光镜下观察。

1.5 心肌免疫组织化学检查

$4\ \mu\text{m}$ 石蜡切片经微波抗原修复后按免疫组化试剂盒说明书操作进行 NF- κ Bp65、CD31、 α -SMA 免疫组织化学染色, DAB 显色。NF- κ B 激活时由细胞浆转到细胞核内, 因此以坏死区周边心肌细胞核的棕黄色阳性染色率反映 NF- κ B 的激活情况; α -SMA 免疫组织化学染色用于标记心肌坏死区肌纤维母细胞; CD31 免疫组织化学染色用于标记心肌毛细血管

(毛细血管直径 $< 20\ \mu\text{m}$ 及与邻近毛细血管、炎性组织或心肌细胞明显区分的任何棕染的内皮细胞都被判定为一个可计数的毛细血管)。在高倍镜 ($\times 400$) 下随机选 5 个视野利用 IPP6.0 图像分析软件计算心肌细胞核阳性率、肌纤维母细胞密度及毛细血管密度, 其中计算肌纤维母细胞密度及毛细血管密度时先在低倍镜找到心肌坏死及边缘区。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析。结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间计量资料差异性测定采用单因素方差分析, 同时应用了两两比较 SNK 检验; 两组计量资料差异性测定采用两样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 超声心动图检查结果

超声心动图显示实验第 14 天, 实验组、治疗组与对照组相比, LVEDD 和 LVESD 均显著性增大 ($P < 0.01$), EF 显著下降 ($P < 0.01$); LVEDD、LVESD、EF 变化治疗组比实验组更明显, 但两者差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。实验第 28 天, 实验组、治疗组 LVEDD、LVESD 较前继续增大, EF 继续下降; 治疗组与实验组比较, LVEDD 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), LVESD 增大更为明显 ($P < 0.05$), EF 下降更为显著 ($P < 0.01$, 表 2)。超声心动图发现治疗组中有 2 例出现室壁瘤 (图 1)。

表 1 实验超声心动图检查结果 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	对照组	实验组	治疗组
治疗第 14 天			
<i>n</i>	11	11	10
体重 (g)	291.27 ± 11.11	282.82 ± 10.08	277.70 ± 11.61
LVEDD (mm)	5.60 ± 0.41	6.11 ± 0.39^b	6.30 ± 0.31^b
LVESD (mm)	2.76 ± 0.30	3.77 ± 0.35^b	4.05 ± 0.37^b
EF	$87.10\% \pm 3.26\%$	$73.97\% \pm 4.19\%^b$	$70.42\% \pm 4.99\%^b$
治疗第 28 天			
<i>n</i>	7	7	6
体重 (g)	376.14 ± 6.15	369.86 ± 6.49	364.17 ± 9.28
LVEDD (mm)	5.60 ± 0.46	6.30 ± 0.55^a	6.65 ± 0.49^b
LVESD (mm)	2.67 ± 0.34	4.14 ± 0.50^b	4.75 ± 0.47^{bc}
EF	$87.16\% \pm 3.07\%$	$68.46\% \pm 3.64\%^b$	$61.13\% \pm 3.38\%^{bd}$

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$ 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$ d 为 $P < 0.01$ 与实验组比较。(治疗组中有 1 只大鼠在实验第 5 天死亡)

2.2 心肌病理形态学检查结果

心脏大体标本显示, 第 7 天、14 天各组心肌组织未见明显异常; 第 28 天实验组、治疗组与对照组比较心脏增大, 治疗组心脏增大尤为明显, 实验组、

治疗组心尖部均可见白色斑痕形成, 治疗组有 2 例出现室壁瘤, 均位于心尖部, 对照组未见异常 (图 2)。光镜下显示, 对照组心肌未见异常, 实验组、治疗组均可见灶状坏死, 部分融为大片, 两组心肌坏死面积无明显差别; 第 7 天实验组心肌坏死区域炎症细胞浸润明显多于治疗组, 肉芽组织替代坏死心肌也较治疗组明显 (图 3); 第 28 天, 实验组、治疗组心肌切片中均可见大量纤维组织, 治疗组中室壁瘤形成处室壁变薄, 完全为纤维组织替代。

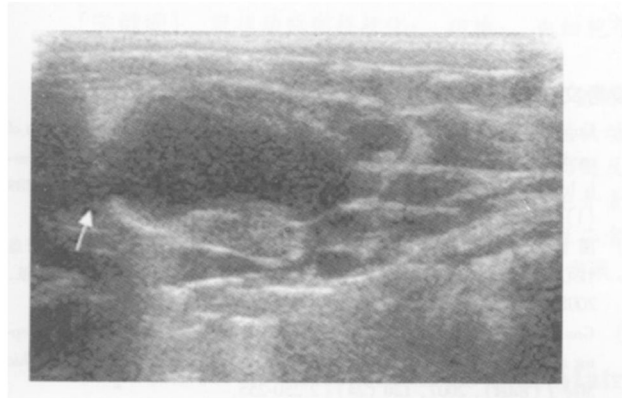


图 1 超声心动图显示室壁瘤形成

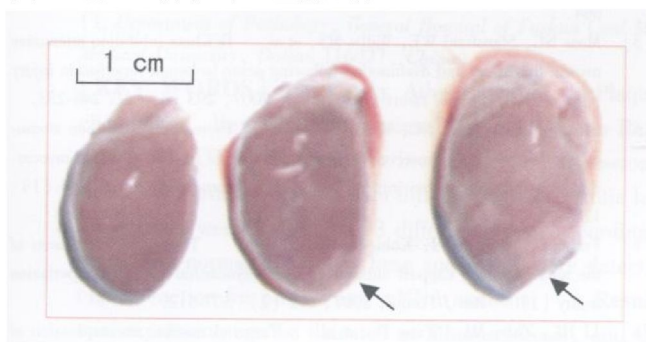


图 2 实验第 28 天大鼠心脏大体标本图 从左到右分别为对照组、试验组和治疗组。实验组箭头所指为心尖部白色斑痕, 治疗组箭头所指为变薄塌陷的室壁瘤。

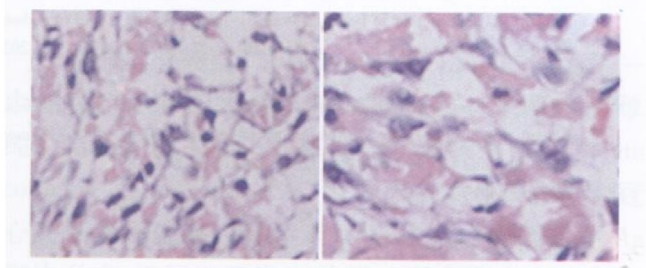


图 3 实验第 7 天心肌病理形态学检查结果 (HE $\times 400$) 左为实验组, 右为治疗组。

2 3 心肌核因子- κ B 的激活及吡咯烷二硫代氨基酸盐的影响

心肌 NF- κ Bp65 免疫组织化学染色显示对照组

几乎无心肌细胞核阳性染色 (1.07%)。第 14 天, 实验组坏死区周边可见明显的心肌细胞核阳性染色 (38.14%); 治疗组坏死区周边心肌细胞核阳性染色明显减少 (17.94%)。

2 4 心肌坏死边缘区毛细血管密度

实验第 14 天 CD31 免疫组化染色显示实验组心肌坏死边缘区毛细血管密度明显高于治疗组 (427.6 ± 67.80 比 189.4 ± 41.91), 差异有显著性 ($P < 0.01$; 图 4)。

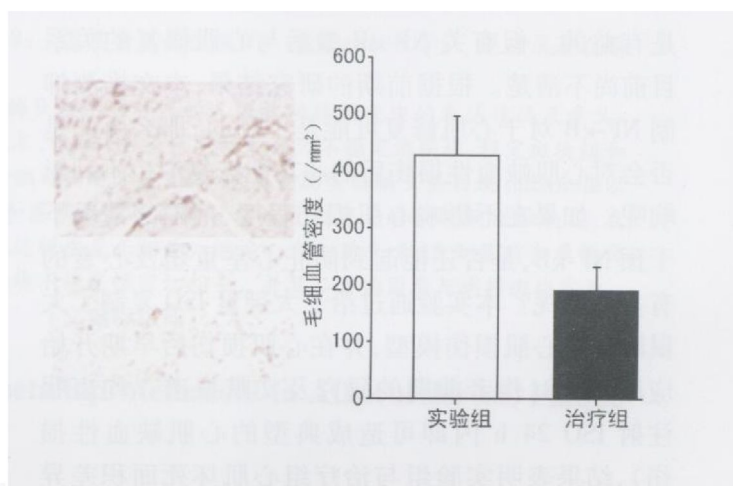


图 4 心肌坏死边缘区毛细血管生成情况 ($\times 100$) 左图为实验第 14 天心肌细胞 CD31 免疫组织化学染色, 左上为实验组, 左下为对照组; 右图为心肌坏死边缘区毛细血管密度。

2 5 心肌坏死区肌纤维母细胞密度

实验第 14 天 α -SMA 免疫组化染色显示实验组心肌坏死区肌纤维母细胞浸润明显高于治疗组 (144.4 ± 36.80 比 87.2 ± 21.92), 差异有显著性 ($P < 0.05$; 图 5)。

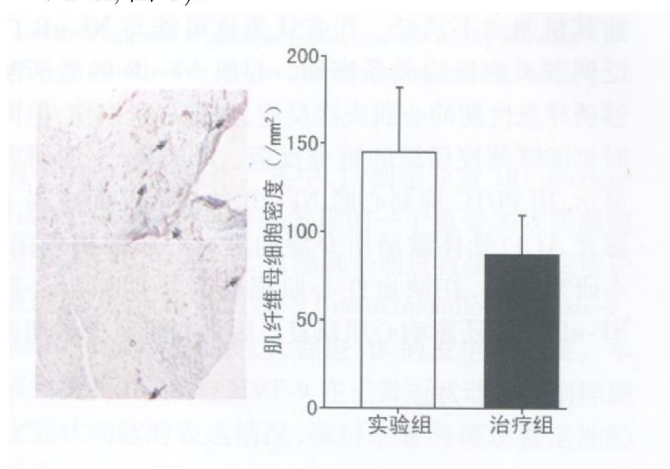


图 5 心肌坏死区肌纤维母细胞浸润情况 ($\times 50$) 左图为实验第 7 天心肌 α -SMA 免疫组织化学染色, 箭头所指为棕染的肌纤维母细胞, 左上为实验组, 左下为治疗组; 右图为心肌坏死区肌纤维母细胞密度。

3 讨论

NF- κ B 是一种具有多向调节作用的核转录因子,广泛调控着与免疫反应、应激反应和炎症反应等相关的基因。在严重缺血性心肌损伤后衰竭心肌 NF- κ B 持续活化^[4], NF- κ B 可能参与了心肌缺血性损伤及其后心衰发生、发展的全过程。心肌损伤和心肌修复对心肌缺血性损伤后的心功能演变均能造成影响。目前多项报道^[5-8]表明通过不同的途径抑制 NF- κ B 激活均能减轻心肌缺血性损伤,这对预后是有益的。但有关 NF- κ B 激活与心肌修复的关系目前尚不清楚。根据前期的研究结果,本文推测抑制 NF- κ B 对于心肌修复可能是不利的,那么由此是否会对心肌缺血性损伤后的心功能恢复产生不利影响呢?如果在不影响心肌损伤程度、范围的情况下干预 NF- κ B 是否还能起到防止心室重塑及心衰的有益作用呢?本实验通过给予大剂量 ISO 复制了大鼠缺血性心肌损伤模型,并在心肌损伤后早期开始应用 PDTC(作者前期的研究及文献报道^[9]均表明注射 ISO 24 h 内即可造成典型的心肌缺血性损伤),结果表明实验组与治疗组心肌坏死面积差异无显著性;心肌损伤后应用 PDTC 同样有效抑制了心肌 NF- κ B 的激活,并且除导致肉芽组织替代受损心肌组织延迟外,还明显抑制了心肌坏死边缘区毛细血管的形成和心肌坏死区肌纤维母细胞的浸润;治疗组室壁瘤的发生较实验组明显增加,实验第 28 天,治疗组心功能降低较实验组更为明显,差异有显著性。

为何心肌缺血性损伤的不同时间抑制心肌 NF- κ B 的激活会对其后的心功能产生不同影响呢?目前其机制尚不清楚。作者认为这可能与 NF- κ B 广泛调节炎症反应关系密切。心肌 NF- κ B 的激活能够诱导急性期的心肌炎症反应、加重心肌损伤,但同时也能够调控后续的抗炎反应。Zhao 等^[10]的研究显示,用 PDTC 抑制心肌 NF- κ B 的激活反而减弱了腺苷 A(3)受体激活所介导的延迟心肌保护作用。本研究表明,在缺血性心肌损伤后早期抑制心肌 NF- κ B 可能还影响心肌修复。因为心肌愈合早期肉

芽组织替代受损心肌、毛细血管形成以及肌纤维母细胞的浸润对于心肌修复是有益的。早期干扰心肌修复可能增加致心律失常的潜在危险或倾向于发生机械性并发症,如心脏破裂、心室壁瘤形成^[11],而以上并发症的出现对于心功能的影响肯定是不利的。尽管目前许多研究显示抑制 NF- κ B 的激活对减轻心肌损伤有益,但对其后心功能演变的影响可能存在时效性差异,如何适时、合理的通过干预 NF- κ B 来治疗心肌缺血性损伤及其后的心衰尚有待深入研究。

[参考文献]

- [1] Gupta S, Young D, Sen S. Inhibition of NF- κ B induces regression of cardiac hypertrophy independent of blood pressure control in spontaneously hypertensive rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005; **289** (1): H20-H29.
- [2] 潘波,杨成明,曾春雨,等. 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐对大鼠缺血性心肌损伤后心室扩张及心衰的干预效应 [J]. *第三军医大学学报*, 2008; **30** (22): 2128-2131.
- [3] Gan RT, Li WM, Xi CH, et al. Chronic blocking of beta 3-adrenoceptor ameliorates cardiac function in rat model of heart failure [J]. *Chin Med J (Engl)*. 2007; **120** (24): 2250-2255.
- [4] 谢萍,徐义先,祝善俊,等. 肿瘤坏死因子 α 介导大鼠心肌梗死后心功能变化的机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004; **12** (6): 662-664.
- [5] Moss NC, Stansfield WE, Willis MS, et al. κ B inhibition attenuates myocardial injury and dysfunction following acute ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; **293** (4): H248-H253.
- [6] Stansfield WE, Moss NC, Willis MS, et al. Proteasome inhibition attenuates infarct size and preserves cardiac function in a murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Ann Thorac Surg*. 2007; **84** (1): 120-125.
- [7] Frantz S, Tilhanns J, Kuhlencordt PJ, et al. Tissue-specific effects of the nuclear factor κ B subunit p50 on myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Pathol*. 2007; **171** (2): 507-512.
- [8] Li HL, Zhuo ML, Wang D, et al. Targeted cardiac overexpression of A20 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction [J]. *Circulation*. 2007; **115** (14): 1885-1894.
- [9] 吕国菊,白智峰,李大强,等. 抑制转录因子核因子保护大鼠心肌缺血的研究 [J]. *临床心血管病杂志*, 2002; **18** (8): 389-391.
- [10] Zhao TC, Kukreja RC. Late preconditioning elicited by activation of adenosine A(3) receptor in heart: role of NF- κ B, NOS and mitochondrial K(ATP) channel [J]. *J Mol Cell Cardiol*. 2002; **34** (3): 263-277.
- [11] Dewald O, Zymek P, Winkemann K, et al. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts [J]. *Circ Res*. 2005; **96** (8): 881-889.

(此文编辑 李玲玲)