

耐力训练对异丙肾上腺素致大鼠心肌肥厚中核因子 κ B 信号通路的影响

王奇¹, 梅蒙², 齐志敏², 王洪新²

(锦州医科大学 1. 体育教研部, 2. 辽宁省心脑血管药物研究重点实验室, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 耐力训练; 心肌肥厚; 异丙肾上腺素; 核因子 κ B

[摘要] **目的** 探讨耐力训练对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌肥厚的保护作用及其机制。**方法** SD 大鼠 32 只, 随机分成 4 组: 正常对照组、异丙肾上腺素组、异丙肾上腺素+耐力训练组、耐力训练组。心肌肥厚模型建立采用腹腔注射异丙肾上腺素, 耐力训练采用每天 1 h 无负重游泳训练, 6 天/周, 共 4 周。采用称重法计算全心质量指数(HMI)、左心室质量指数(LVMI); 常规 HE 染色观察心肌细胞横截面积; real-time PCR 测定心房钠尿肽(ANP)、脑钠尿肽(BNP)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 1β (IL- 1β) mRNA 表达水平; Western blot 检测心肌组织中 p65、I κ B 蛋白表达水平。**结果** 与正常对照组相比, 异丙肾上腺素组大鼠的 HMI、LVMI 和心肌细胞表面积显著增加; ANP 和 BNP mRNA 表达上调, TGF- β 1、TNF- α 和 IL- 1β mRNA 表达水平增加; 心肌细胞核内 p65 表达上调, 而 I κ B 表达下调。与异丙肾上腺素组相比, 异丙肾上腺素+耐力训练组能显著降低 HMI、LVMI 和心肌细胞表面积, 同时能下调 ANP 和 BNP mRNA 表达水平; 降低炎症因子 TGF- β 1、TNF- α 以及 IL- 1β mRNA 的表达水平, 同时减少心肌细胞核内 p65 的表达增加 I κ B 的表达。**结论** 耐力训练可以有效改善异丙肾上腺素诱导的实验性心肌肥厚, 其机制可能与抑制核因子 κ B 炎症信号通路有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Moderate Exercise Training Attenuates Cardiac Hypertrophy Induced by Isoproterenol via Nuclear Factor- κ B Signaling in Rats

WANG Qi¹, MEI Meng², QI Zhi-Min², and WANG Hong-Xin²

(1. Department of Physical Education, 2. Key Laboratory of Cardiovascular and Cerebrovascular Drug Research of Liaoning Province, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] Exercise Training; Myocyte Hypertrophy; Isoproterenol; Nuclear Factor- κ B

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect of moderate exercise training on isoproterenol-induced cardiac hypertrophy and the potential mechanism. **Methods** Thirty-two SD rats were randomly assigned to following groups: control group, isoproterenol group, isoproterenol plus exercise training group and exercise training group. Isoproterenol was injected intraperitoneally for two weeks to create the cardiac hypertrophy model. Rats were forced to swim for 1 hour with nothing attached to the tail, 6 days per week for 4 weeks. Heart mass index (HMI) and left ventricular mass index (LVMI) of rats were calculated using weighing method. Surface area of cardiomyocyte was detected by HE staining. The mRNA expression levels of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukine-1 beta (IL- 1β) were measured by Real-time PCR and the proteins expression of p65 and I κ B were measured by Western blot. **Results** Compared with the control group, isoproterenol group showed the significantly increases of HMI, LVMI, surface area of cardiomyocyte, mRNA levels of ANP, BNP, TGF- β 1, TNF- α , IL- 1β and the protein expression of p65 in nuclei. Whereas the expression of I κ B was decreased. Compared with isoproterenol group, isoproterenol plus exercise training group decreased HMI, LVMI and surface area of cardiomyocyte. In addition, isoproterenol plus exercise training group significantly down-regulated mRNA ex-

[收稿日期] 2016-03-07

[修回日期] 2016-05-03

[作者简介] 王奇, 讲师, 研究方向为运动与心脏功能, E-mail 为 1245355375@qq.com。梅蒙, 硕士, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 meimeng1992@126.com。通讯作者王洪新, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理学和天然药物药理学, E-mail 为 jyhswang@163.com。

pression of ANP, BNP, TGF- β 1, TNF- α and IL-1 β and p65 protein expression in nuclei while increased the protein expression of I κ B. **Conclusion** Moderate exercise training attenuates cardiac hypertrophy induced by isoproterenol via NF- κ B signaling in rats.

心肌肥厚是一种主要表现为心肌细胞体积增大、蛋白质含量增多,并常常伴随着炎症的病理变化,早期的心肌肥厚有助于维持心脏功能,而持续的心肌肥厚则会引起心功能失常,最终导致心力衰竭甚至死亡^[1]。因此,深入认识心肌肥厚的发生发展机制,对防治心肌肥厚发生具有重要意义。核因子 κ B(nuclear Factor- κ B, NF- κ B)是一种对多种细胞因子、生长因子和炎症因子起调控作用的转录因子,其广泛参与不同刺激因素诱导的心肌肥厚^[2-4]。近年来,国内外一些学者提出通过运动训练等非药物对心血管疾病进行辅助治疗,后证实适当的耐力训练对心脏结构与功能都有一定的积极作用,并有助于改善预后以及提高患者的生活质量^[5-6],但相关机制尚未阐明。本研究应用异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)制作心肌肥厚大鼠模型,通过观察耐力训练对 NF- κ B 信号通路的影响,来探讨其对心肌肥厚的作用和潜在的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重 200 ± 20 g,由锦州医科大学实验动物中心提供,动物合格证为 SCXK 2009-0004。

1.2 药品与试剂

ISO (Sigma 公司); I κ B 一抗、p65 一抗、 β -actin 一抗、Lamin B 一抗 (Santa Cruz 公司); 细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒 (Beyotime 公司); TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司); HiScript[®] II One Step qRT-PCR SYBR[®] Green 试剂盒 (诺唯赞生物公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 实验分组及模型制备

SD 大鼠 32 只,随机分为 4 组,每组 8 只:正常对照组、异丙肾上腺素组 (ISO)、异丙肾上腺素+耐力训练组 (ISO+耐力训练组)、耐力训练组。正常对照组:连续 2 周腹腔注射生理盐水,不进行游泳训练; ISO 组:连续 2 周腹腔注射异丙肾上腺素 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,不进行游泳训练; ISO+耐力训练组:连续 2 周腹腔注射异丙肾上腺素 $5 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,肥厚模型建立后进行无负重游泳训练,1 h/天,6 天/周,共 4 周;耐力训练组:连续 2 周腹腔注射生理盐水,2

周后进行上述游泳训练。各组于第 4 周末取材进行指标检测。

1.4 心脏质量参数测定

大鼠称重 (body weight, BW), 20% 乌拉坦 ($0.5 \text{ mL}/100 \text{ g}$) 麻醉并迅速开胸取心脏,剪去周围组织及血管,预冷 PBS 冲净血污,滤纸吸干,称取全心质量 (heart weight, HW) 和左心室质量 (left ventricle weight, LVW)。计算全心质量指数 (heart mass index, HMI = HW/BW) 和左心室质量指数 (left ventricle mass index, LVMI = LVW/BW)。

1.5 HE 染色测定心肌细胞横径

取左心室心肌,4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片 ($5 \mu\text{m}$), HE 染色。光镜下每张切片随机选取 8 个视野,采用 Image-PRO Plus 软件进行心肌细胞表面积测量。

1.6 real time-PCR 法检测心肌组织 ANP、BNP、TGF- β 1、TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达

取约 100 mg 心肌组织,加入约 800 μL Trizol 剪碎组织,冰上静置 5 min 后加入 200 μL 氯仿,震荡 15 s,静置 15 s,重复 3 次,冰上静置 3 min 后 12000 r/min 4°C 离心 15 min。取上清并加入等体积异丙醇,上下混匀,冰上静置 10 min 后 12000 r/min 4°C 离心 10 min。弃上清,加入 1 mL 75% 预冷乙醇,上下颠倒洗涤后 7500 r/min 4°C 离心 5 min。弃上清,敞口干燥后加入 20 μL DEPC 超纯水溶解,并与 -80°C 保存。取约 500 ng 总 RNA,采用一步法进行逆转录和扩增反应。反应条件:Reps:1 50°C 3 min; Reps:1 95°C 5 min; Reps:40 95°C 5 s, 60°C 30 s; Reps:1 Default;反应后上机检测并进行结果分析。心房钠尿肽 (ANP):上游 5'-ATG GGC TCC TTC TCC ATC AC-3',下游 5'-TTT CTC CTC CAA GGT GGT C-3';脑钠尿肽 (BNP):上游 5'-GGG CTG TAC CGG GCT GAG GTT-3',下游:5'-AGT TTG TGG CTG GAA GAA TAA GA-3';转化生长因子 β 1 (TGF- β 1):上游 5'-TGG CGT TAC CTT GGT AAC C-3',下游 5'-GGT GTT GAG CCC TTT CCA G-3';肿瘤坏死因子 α (TNF- α):上游 5'-AAA TGG GCT CCC TCT ATC AGT TC-3',下游 5'-TCT GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC-3';白细胞介素 1 β (IL-1 β):上游 5'-GGA TGA TGA CGA CCT GCT AG-3',下游 5'-CAC TTG TTG GCT TAT GTT CTG T-3';内参 GAPDH:上游 5'-

TGC ACC ACC AAC TGC TTA GC-3', 下游 5'-GCC CCA CGG CCA TCA-3'。

1.7 大鼠心肌细胞核蛋白提取

取约 100 mg 新鲜心肌组织,冰上剪碎,加入预冷的含 PMSF 的细胞浆蛋白抽提液,匀浆。4℃、1500 g 离心 5 min,取沉淀,并沉淀中加入含 PMSF 的细胞浆蛋白抽提试剂 A,涡旋 5 s,冰上静置 15 min 后加入细胞浆蛋白抽提试剂 B,剧烈涡旋 5 s 后 4℃、12000 g 离心 5 min,取沉淀加入含 PMSF 的细胞核蛋白抽提试剂,反复涡旋 30 min 后 4℃、12000 g 离心 10 min,取上清即为细胞核蛋白。

1.8 Western blot 检测

取约 100 mg 心肌组织,冰上剪碎并加入含 1% PMSF 的 RIPA 强裂解液 1 mL,超声粉碎 30 s,冰上静置 30 min,4℃、12000 r 离心 20 min,取上清。BCA 法测定蛋白浓度后,用 TBS 进行蛋白配平并加入适量 5×SDS 上样缓冲液,100℃煮 5 min。灌胶上样进行 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,根据 Marker 移动情况及目的蛋白分子量大小适时终止电泳,转至 PVDF 膜,1% BSA 封闭 1.5 h,TBST 洗膜 3 次,5 min/次,加入 p65、IκB、β-actin 和 Lamin B 一抗,4℃杂交过夜,TBST 洗膜 3 次,10 min/次,二抗室温杂交 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,ECL 显影,上机检测。采用 Image Lab 软件进行分析。

1.9 统计学方法

统计数据以 SPSS 18.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间显著性检验采用单因素方差分析和 SNK 法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 耐力训练对大鼠心脏指数的影响

与正常对照组相比,ISO 组大鼠 HMI 和 LVMI 均明显增加,差异有统计学意义。与 ISO 组相比,异丙肾上腺素造模后进行耐力训练能显著减少 HMI 和 LVMI,表明耐力训练能改善异丙肾上腺素诱导的实验性心肌肥厚(表 1)。

表 1. 耐力训练对大鼠全心质量指数和左心室质量指数的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1. The effect of moderate exercise training on heart mass index and left ventricular mass index in rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分 组	HMI(mg/g)	LVMI(mg/g)
正常对照组	2.42±0.13	1.48±0.19
ISO 组	3.51±0.22 ^a	2.37±0.31 ^a
ISO+耐力训练组	2.85±0.17 ^b	1.81±0.23 ^b
耐力训练组	2.53±0.09 ^a	1.66±0.14 ^a

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组相比;b 为 $P < 0.05$,与 ISO 组相比。

2.2 耐力训练对大鼠心肌细胞横截面积的影响

与正常对照组相比,ISO 组大鼠心肌细胞变大,细胞表面积明显增加。与 ISO 组相比,ISO+耐力训练组心肌细胞横截面积减小。进一步证明耐力训练能抑制异丙肾上腺素引起的心肌肥厚(图 1 和表 2)。

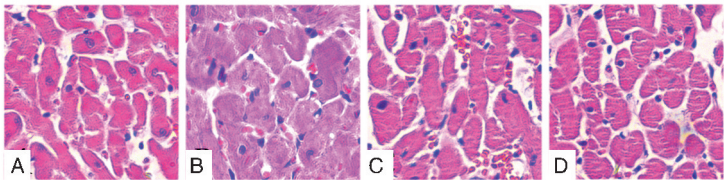


图 1. 耐力训练对大鼠心肌细胞横截面积的影响 A 为正常对照组,B 为 ISO 组,C 为 ISO+耐力训练组,D 为耐力训练组。

Figure 1. The effect of moderate exercise training on surface area of myocardial cells in rats

表 2. 耐力训练对大鼠心肌细胞横截面积的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2. The effect of moderate exercise training on surface area of myocardial cells in rats($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分 组	心肌细胞横截面积(μm^2)
正常对照组	213.34±17.93
ISO 组	452.47±31.54 ^a
ISO+耐力训练组	361.77±23.15 ^b
耐力训练组	255.85±19.02 ^a

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组相比;b 为 $P < 0.05$,与 ISO 组相比。

2.3 耐力训练对心肌组织 ANP 和 BNP mRNA 表达的影响

与正常对照组相比,ISO 组表现为 ANP 和 BNP mRNA 表达水平均增加。与 ISO 组相比,ISO+耐力训练组能明显减少 ANP 和 BNP mRNA 表达。进一步验证了耐力训练能改善异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚(表 3)。

表 3. 耐力训练对心肌组织 ANP 和 BNP mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3. The effect of moderate exercise training on the mRNA expression of ANP and BNP in rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

分 组	ANP/GAPDH	BNP/GAPDH
正常对照组	0.35±0.02	0.28±0.01
ISO 组	0.78±0.16 ^a	0.64±0.04 ^a
ISO+耐力训练组	0.52±0.09 ^b	0.48±0.05 ^b
耐力训练组	0.41±0.11	0.33±0.02 ^a

a 为 $P<0.05$,与正常对照组相比;b 为 $P<0.05$,与 ISO 组相比。

2.4 耐力训练对心肌组织 TGF-β1、TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达的影响

与正常对照组相比,ISO 组实时定量 PCR 结果显示炎症因子 TGF-β1、TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达水平上调,而异丙肾上腺素处理后进行耐力训练能显著抑制炎症因子释放,表现为与 ISO 组相比,TGF-β1、TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达水平下调(表 4)。

表 4. 耐力训练对心肌组织 TGF-β1、TNF-α 和 IL-1β mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4. The effect of moderate exercise training on the mRNA expression of TGF-β1, TNF-α and IL-1β in rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

分 组	TGF-β1/ GAPDH	TNF-α/ GAPDH	IL-1β/ GAPDH
正常对照组	0.08±0.03	0.37±0.06	0.20±0.05
ISO 组	0.53±0.15 ^a	0.81±0.11 ^a	0.58±0.12 ^a
ISO+耐力训练组	0.31±0.12 ^b	0.58±0.07 ^b	0.34±0.08 ^b
耐力训练组	0.14±0.06 ^a	0.29±0.09 ^a	0.14±0.06 ^a

a 为 $P<0.05$,与正常对照组相比;b 为 $P<0.05$,与 ISO 组相比。

2.5 耐力训练对心肌组织 IκB 和细胞核 p65 蛋白表达的影响

与正常对照组相比,ISO 组表现为 IκB 蛋白表达减少而胞核 p65 蛋白增加。而与 ISO 组相比,ISO +耐力训练组能明显提高 IκB 蛋白表达而降低胞核 p65 蛋白表达(图 2 和表 5)。

3 讨 论

NF-κB 蛋白家族由 p50(NF-κB 1)、p52(NF-κB 2)、p65(Rel A)、Rel B 和 c-Rel 5 种同源性很高的蛋白组成^[7],最常见的是 p65 与 p50 形成的异源二聚体。作为一种重要的转录因子,NF-κB 广泛参与

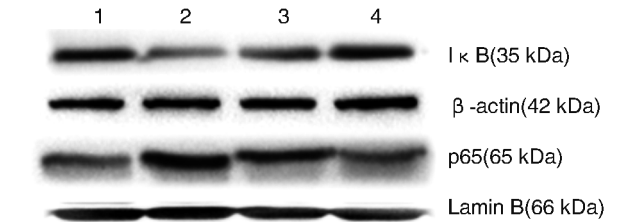


图 2. 耐力训练对心肌组织 IκB 和细胞核 p65 蛋白表达的影响 1 为正常对照组,2 为 ISO 组,3 为 ISO+耐力训练组,4 为耐力训练组;Lamin B 为核蛋白标记物。

Figure 2. The effect of moderate exercise training on the protein expression of IκB and p65

表 5. 耐力训练对心肌组织 IκB 和细胞核 p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 5. The effect of moderate exercise training on the protein expression of IκB and p65($\bar{x}\pm s, n=8$)

分 组	IκB/β-actin	p65/Lamin B
正常对照组	1.13±0.12	0.64±0.04
ISO 组	0.63±0.09 ^a	1.53±0.14 ^a
ISO+耐力训练组	0.82±0.07 ^b	1.08±0.15 ^b
耐力训练组	1.25±0.15 ^a	0.50±0.07 ^a

a 为 $P<0.05$,与正常对照组相比;b 为 $P<0.05$,与 ISO 组相比。

真核细胞的炎症、氧化应激、细胞凋亡等病理过程的调控。静息状态下,NF-κB 的 p65 亚基与 IκB 形成无活性复合物存在于胞浆中^[8],当受到脂多糖及活性氧自由基等的刺激时,NF-κB 经典信号通路被激活,IκB 蛋白发生磷酸化而降解,二聚体释放,p65 的 S276 亚基发生磷酸化而被激活^[9]并转位至细胞核中与特定的 DNA 位点相结合,并启动下游基因如 IL-1β、IL-8、IL-10、TNF-α、TGF-β1 等炎症细胞因子的转录与表达^[10-11],从而升高整个体系的炎症水平,引起一系列病理变化。此外,耐力训练使得机体血流需求量增加,心脏为了适应机体的这种血供需求,会适应性地使得心脏中心肌细胞体积增大、蛋白合成增加以增强心肌收缩力,增大有效射血分数,增加心输出量,最终导致心脏生理性肥大。

本实验结果显示,异丙肾上腺素持续刺激后大鼠 HMI、LVMI 和心肌细胞横径均较正常对照组增加,而异丙肾上腺素刺激后予以游泳耐力训练则可以显著对抗这种增加,表明耐力训练可以抑制异丙肾上腺素诱导的病理性心肌肥厚。进一步深入研究发现,ISO 组 NF-κB 抑制蛋白 IκB 的表达明显减少而细胞核中 p65 表达增加,异丙肾上腺素造模后予以耐力训练能增加 IκB 的表达同时降低胞核 p65 蛋白表达,提示耐力训练减轻异丙肾上腺素所致的

心肌肥厚可能与增加 I κ B 表达,抑制 NF- κ B 活化,减少 p65 的核转位有关。在 ISO 组 NF- κ B 通路激活后,促使炎症因子 TGF- β 1、TNF- α 和 IL-1 β 的表达大量增加,而通过游泳训练后这些炎症因子的表达显著减少,进而减轻心肌肥厚。同时,我们发现单纯的耐力训练组大鼠心肌组织中 I κ B 表达较正常对照组多而细胞核中 p65 表达较正常对照组少,且 TGF- β 1、TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达减少,提示耐力训练具有较好的心肌保护作用。

综上所述,适当强度的耐力训练可改善异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚,具体机制可能与其能够抑制 NF- κ B 信号通路激活从而减少炎症因子如 TGF- β 1、TNF- α 和 IL-1 β 的释放,进而减轻心肌肥厚有关。这为心肌肥厚的非药物辅助治疗提供了新方向,但具体的机制还需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Hughes SE. The pathology of hypertrophic cardiomyopathy [J]. *Histopathology*, 2004, 44(5): 412-427.
- [2] Yan SH, Zhao NW, Zhu XX, et al. Benazepril inhibited the NF-kappaB and TGF-beta networking on LV hypertrophy in rats [J]. *Immunol Lett*, 2013, 152(2): 126-134.
- [3] Zhang C, Wang F, Zhang Y, et al. Celecoxib prevents pressure overload-induced cardiac hypertrophy and dysfunction by inhibiting inflammation, apoptosis and oxidative stress[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(1): 116-127.
- [4] Yu XJ, Zhang DM, Jia LL, et al. Inhibition of NF-kappaB activity in the hypothalamic paraventricular nucleus attenuates hypertension and cardiac hypertrophy by modulating cytokines and attenuating oxidative stress[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2015, 284(3): 315-322.
- [5] Rajani R, Rimington H, Chambers JB. Treadmill exercise in apparently asymptomatic patients with moderate or severe aortic stenosis: relationship between cardiac index and revealed symptoms[J]. *Heart*, 2010, 96(9): 689-695.
- [6] Asrar Ul Haq M, Goh CY, Levinger I, et al. Clinical utility of exercise training in heart failure with reduced and preserved ejection fraction[J]. *Clin Med Insights Cardiol*, 2015, 9: 1-9.
- [7] Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines [J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(3): 253-266.
- [8] 王晓晨, 吉爱国. NF- κ B 信号通路与炎症反应[J]. *生理科学进展*, 2014, 45(1): 68-71.
- [9] Majdalawieh A, Ro HS. Regulation of IkappaB alpha function and NF-kappaB signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 823, 821.
- [10] Serra AJ, Santos MH, Bocalini DS, et al. Exercise training inhibits inflammatory cytokines and more than prevents myocardial dysfunction in rats with sustained beta-adrenergic hyperactivity [J]. *J Physiol*, 2010, 588(Pt13): 2431-442.
- [11] 吴炜景, 李跃飞, 李理, 等. 沉默 NF- κ B p65 基因下调 TNF- α 诱导的肺泡上皮细胞的炎症反应[J]. *免疫学杂志*, 2012, 28(1): 24-28.

(此文编辑 许雪梅)