论著

文章编号:1000-5404(2008)22-2128-04

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

潘 波[1],杨成明[1],曾春雨[1],王旭开[1],熊秀勤[2],何多芬[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 400042)

摘 要:目的 研究核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)抑制剂——吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)对异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)所致大鼠缺血性心肌损伤后心室扩张、心衰的防治作用及其作用机制。**方法** 应用大剂量ISO建立大鼠缺血性心肌损伤模型。70只雄性Wistar大鼠利用随机数字表法分为3组:对照组20只,实验组(ISO组)30只,治疗组(ISO +PDTC组)20只。检查心肌病理形态学、心肌NF-κB激活情况、心肌单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)mRNA表达情况及血清MCP-1水平,并在实验第14天进行超声心动图检查,观察心室扩张及心功能变化情况。**结果** ISO所致大鼠缺血性心肌损伤后心肌NF-κB被激活,心肌MCP-1 mRNA表达增加($P<0.01$),血清MCP-1增高($P<0.01$);PDTC能够抑制NF-κB的激活,下调心肌MCP-1 mRNA的表达及血清MCP-1水平($P<0.01$),减轻心肌炎症反应,减小心肌细胞损伤范围,但同时可导致肉芽组织替代受损心肌延迟;实验第14天,治疗组左心室收缩末期内径(LVESD)较实验组减小($P<0.05$),射血分数(EF)优于实验组($P<0.05$)。**结论** 应用PDTC能够对心肌缺血性损伤后的心室扩张、心功能损害起到一定的防治作用,该作用可能主要得益于在心肌损伤急性期对心肌细胞的保护作用,其机制可能与抑制NF-κB的激活进而下调MCP-1的表达、减轻心肌炎症损伤有关。

关键词:核因子-κB抑制剂;单核细胞趋化蛋白-1;心肌缺血性损伤;心室扩张;心衰
中图法分类号:R541.62;R542.2;R972 **文献标识码**:A

Protective effects of PDTC on ventricular dilatation and heart failure induced by experimental myocardial ischemic injury in rats

PAN Bo[1], YANG Cheng-ming[1], ZENG Chun-yu[1], WANG Xu-kai[1], XIONG Xiu-qin[2], HE Duo-fen[1] ([1]Department of Cardiology, [2]Department of Ultrasound Diagnosis, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the protective effects of nuclear factor-κB inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), on ventricular dilatation and heart failure induced by experimental myocardial ischemic injury in rats and its mechanisms. **Methods** High dose of isoprenaline (ISO) was used to induce experimental myocardial ischemic injury in rats. Seventy male Wistar rats were divided into three groups: control group (20 rats), ISO group (30 rats) and ISO + PDTC group (20 rats). Myocardial pathomorphologic changes, NF-κB p65 activation, MCP-1 mRNA expression and serum MCP-1 were investigated. Then ventricular dilatation and left ventricular (LV) function were assessed by echocardiography on day 14 of the experiment. **Results** Myocardial NF-κB was activated, and MCP-1 mRNA expression and serum MCP-1 increased markedly after myocardial ischemic injury induced by ISO ($P<0.01$). PDTC inhibited the activation of myocardial NF-κB and significantly decreased myocardial MCP-1 mRNA expression ($P<0.01$), serum MCP-1 ($P<0.01$), myocardial inflammation and injury. On the other hand, PDTC delayed replacement of the damaged myocardium with granulation tissue. On day 14 of the experiment, a marked decrease in left ventricular end-systolic dimension (LVESD) and a significant increase in percentage of ejection fraction were observed in ISO + PDTC group compared with ISO group ($P<0.05$). **Conclusion** The protective effects of PDTC on ventricular dilatation and heart failure may mainly be acquired from the acute stage of heart injury, which mechanisms are probably

作者简介:潘 波,男,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事心血管疾病的临床及基础方面的研究。电话:(023)68757810,E-mail: pb1240@sina.com
通信作者:杨成明,电话:(023)68757801,E-mail:yangchmi@163.com
收稿日期:2008-05-14;**修回日期**:2008-07-05

associated with inhibited activation of myocardial NF-κB, decreased myocardial MCP-1 mRNA expression, serum MCP-1, lessened myocardial inflammation and injury.

Key words: nuclear factor-κB inhibitor; monocyte chemoattractant protein-1; myocardial ischemic injury; ventricular dilatation; heart failure

严重的心肌缺血性损伤可以诱发心室扩张出现扩张性心肌病样改变,最终导致心衰。目前对这一病理过程尚无理想的防治措施。近期多项研究表明,吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)作为核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB)的特异性抑制剂对缺血性损伤的心肌细胞具有保护作用。Gupta 等[1]报道给自发性高血压大鼠应用 PDTC 能够减轻心室重塑;李红莉等[2]报道 PDTC 能够防治阿霉素诱发的扩张性心肌病。那么应用 PDTC 进行抗 NF-κB 治疗是否也能有效防治缺血性心肌损伤后的心室扩张这一心室重塑过程及心衰的发生? 为验证这一假设,本实验以大剂量异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)建立大鼠缺血性心肌损伤模型,观察应用 PDTC 治疗对心脏结构、心功能、心肌病理形态学的影响,同时对心肌 NF-κB、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)进行检测,探讨其作用机制。

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,Trizol 试剂为美国 Invitrogen 公司分装产品,RT-PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司,大鼠 MCP-1 ELISA 检测试剂盒购自上海森雄公司(Biosource 公司生产,进口分装),兔抗人 NF-κB p65 多克隆抗体购自武汉博士德公司,免疫组化 PV-6001 二步法检测试剂购自北京中杉公司。根据 GeneBank 核苷酸序列应用引物设计软件 Primer 5.0 设计引物,由上海生工公司合成 2 对引物:MCP-1 上游引物:5′-AATGAGTCGGCTGGAGAA-3′,下游引物:5′-AGTGCTTGAGGTGGTTGTG-3′;GAPDH 上游引物:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′,下游引物:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′。

1.2　大鼠心肌损伤模型的建立及分组

雄性成年 Wistar 大鼠 70 只,体质量(200 ± 20)g,由本院实验动物中心提供。建立缺血性心肌损伤模型,造模方法参考文献[3]。利用随机数字表法将大鼠分为对照组(20 只)、实验组(30 只)和治疗组(20 只)。其中实验组以 ISO 170 mg/kg 皮下注射,24 h 后重复 1 次,之后不再作特殊处理;治疗组注射 ISO 同实验组,并在首次注射 ISO 前 1 h 即开始经腹腔注射 PDTC 100 mg/kg,每日 1 次,连续 14 d;对照组用相同容量的生理盐水代替 ISO 进行皮下注射。分别在实验第 3、7 天每组中随机抽取 3 ~ 5 只大鼠在注射药物后 12 h 处死,留取标本进行相关检测;第 14 天所有存活大鼠进行超声心动图检查,随后处死留取标本检查。

1.3　超声心动图检查

实验第 14 天在腹腔给药后 12 h 对所有存活大鼠进行超声心动图检查。将大鼠以戊巴比妥钠 40 mg/kg 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,测量大鼠左心室长轴二维图像和左心室乳头肌水平 M 型超声,计算机自动计算左心室舒张末期内径(LVEDD)、左心室收缩末期内径(LVESD)、射血分数(EF),测定值均为 5 个心动周期所测定的均值。

1.4　心肌病理形态学检查

大鼠活杀后开胸剪下心脏,取心尖部心肌,以 4 ℃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 μm 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 μm 石蜡切片按免疫组化试剂盒说明书操作进行 NF-κB p65 免疫组织化学染色,DAB 显色。NF-κB 激活时由细胞质转到细胞核内,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-κB 的激活情况。

1.6　心肌 MCP-1 mRNA 检测

取 50 ~ 100 mg 左心室心肌组织匀浆,Trizol 抽提总 RNA,紫外分光光度计测定其浓度及纯度。1 μg RNA 加入到 10 μl 反转录反应体系中,按 RT-PCR 试剂盒说明书操作合成 cDNA。1 μl cDNA、1 μl 引物加入到 25 μl 扩增反应体系中,使用 PCR 扩增仪合成 DNA。反应条件为:94 ℃变性 2 min,然后再 94 ℃变性 30 s,退火 62.3 ℃(MCP-1)、57.4 ℃(GAPDH)30 s,72 ℃延伸 45 s,共 35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min。产物长度 283 bp(MCP-1)、452 bp(GAPDH)。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色、照相并经光密度仪扫描分析,以 GAPDH 的灰度值进行标准校正,计算 MCP-1 产物的相对量。

1.7　血清 MCP-1 检测

大鼠断尾取血,干净促凝管中室温凝固半小时后 1 000 × *g* 离心 15 min,收集血清并分装。按 ElISA 试剂盒说明书操作检测血清 MCP-1 水平。

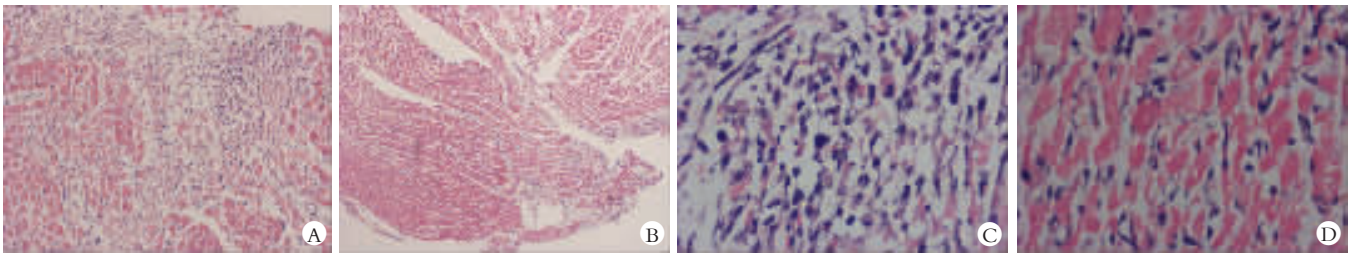
1.8　统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间计量资料差异性测定采用单因素方差分析,同时应用两两比较(SNK 检验)。

2　结果

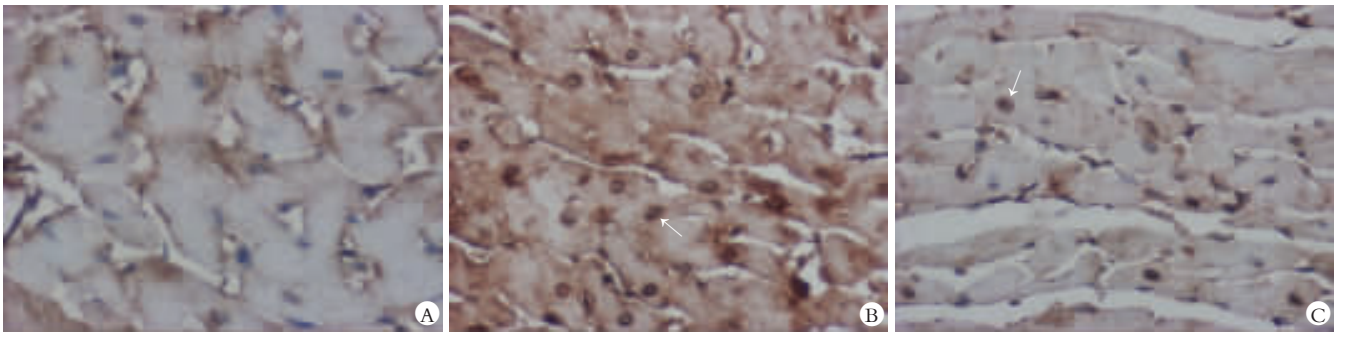
2.1　超声心动图检查结果

实验第 14 天超声心动图显示:实验组、治疗组与对照组相



A:实验组(×40);B:治疗组(×40);C:实验组(×400);D:治疗组(×400)

图1 实验第3天心肌切片HE染色观察



A:对照组;B:实验组;C:治疗组;↑:心肌细胞核阳性染色

图2 实验第3天心肌切片NF-κB免疫组化染色观察 (S-P×400)

比,LVEDD、LVESD均增大,EF显著下降($P<0.05$,$P<0.01$);治疗组与实验组相比,LVEDD无统计学差异($P>0.05$),LVESD增大程度明显减轻($P<0.05$),EF下降程度明显减轻($P<0.05$,表1)。

表1 实验第14天超声心动图检查结果

组别	n	LVEDD(mm)	LVESD(mm)	EF(%)
对照组	11	5.60±0.41	2.76±0.30	87.10±3.26
实验组	11	6.11±0.39[a]	3.77±0.35[b]	73.97±4.19[b]
治疗组	8	5.83±0.32	3.41±0.37[bc]	78.19±4.35[bc]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较;c:$P<0.05$,与实验组比较

2.2 心肌病理形态学检查结果

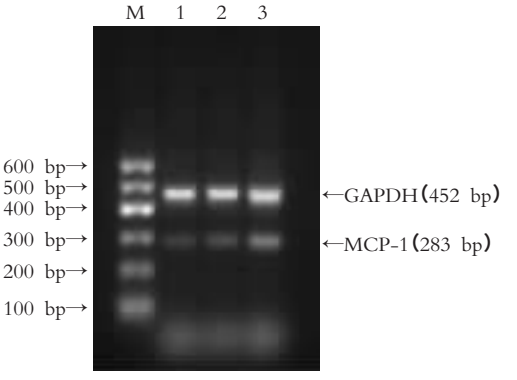
HE染色光镜下显示:各时间段对照组心肌未见异常;实验第3天实验组心肌可见大范围灶状坏死,坏死病灶从心内膜下至心外膜下均有分布,受损部位及附近心肌组织内可见大量炎症细胞浸润(图1A);治疗组可见小灶状坏死,损伤范围较实验组明显减小,主要位于心内膜下,炎症细胞浸润也较实验组明显减少(图1B);在同一时间点,实验组坏死心肌组织多为肉芽组织所替代(图1C),而治疗组肉芽组织替代坏死心肌组织延迟,仍可见坏死心肌(图1D)。第7天实验组心肌受损区域炎症细胞浸润显著减少,可见成纤维细胞增生;治疗组受损区也可见成纤维细胞增生,同时仍有较明显的炎症细胞浸润。

2.3 心肌NF-κB的激活及PDTC的影响

对照组几乎无心肌细胞核阳性染色(1.03%,图2A)。实验第3天,实验组坏死区周边可见明显的心肌细胞核阳性染色(47.56%,图2B);治疗组坏死区周边心肌细胞核阳性染色明显减少(24.60%,图2C)。第7、14天均有类似情况。以上结果说明ISO所致心肌缺血性损伤病程中存在着NF-κB的激活,PDTC对其有明显抑制作用。

2.4 抑制NF-κB对心肌MCP-1 mRNA表达的影响

心肌组织RT-PCR结果显示各时间点治疗组心肌MCP-1 mRNA表达较实验组均明显降低。实验第3天RT-PCR电泳产物灰度比值:对照组为(0.37±0.14),治疗组为(0.48±0.12),实验组为(0.77±0.12),治疗组与对照组相比无统计学差别($P>0.05$),但治疗组与实验组相比有统计学差异($P<0.01$,图3)。

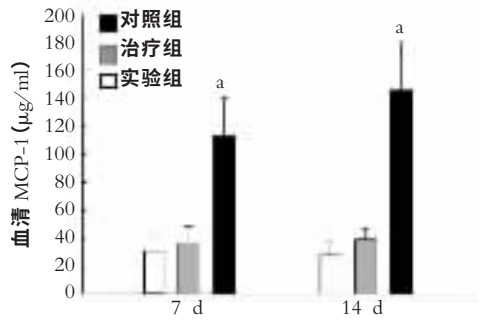


M:标准;1:对照组;2:治疗组;3:实验组

图3 RT-PCR检测实验第3天各组心肌MCP-1 mRNA表达情况

2.5 血清MCP-1的变化

实验第7、14天,治疗组大鼠血清MCP-1水平较实验组显著降低($P<0.01$),说明PDTC在蛋白水平抑制了MCP-1的产生(图4)。



a: $P<0.01$,与治疗组比较

图 4　不同时间点各组血清 MCP-1 水平的变化

3　讨论

近年炎症反应在心血管疾病发生、发展中的作用越来越受到人们重视。在心肌严重缺血性损伤(如心肌梗死)中,伴随的炎症反应更是参与了心肌损伤、愈合、纤维化以及心功能损害的全过程[4]。目前认为 MCP-1 是诱导慢性炎症发生的主要趋化因子[5],它介导的单核/巨噬细胞激活及其向心肌组织的浸润在心肌缺血性损伤病程中发挥着关键性作用[6]。MCP-1 属于趋化因子 C-C 亚族(β 亚族)成员,其基因表达受 NF-κB 调控[7],在各种刺激因素作用下,包括血管内皮细胞、平滑肌细胞、单核/巨噬细胞、心肌细胞等在内的多种细胞均可被诱导分泌 MCP-1[8]。Zachariae 等[9]发现 MCP-1 可诱导巨噬细胞释放溶酶体酶、超氧阴离子并可诱导白细胞的趋化运动,进而损伤心肌组织。Hayashidani 等[8]发现在实验性小鼠心肌梗死模型中进行抗 MCP-1 基因治疗能够减轻左心室重构及心衰。以上研究表明在心肌缺血性损伤进程中抑制 MCP-1 的表达是有益的。但是 MCP-1 在心肌缺血性损伤进程中的作用远非如此简单,Dewald 等[10]发现在利用 MCP-1 基因敲除小鼠造成的心肌梗死模型中,存在着肉芽组织替代受损心肌延迟的现象,并推测这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,而以上并发症的出现对防治心室扩张、心衰进展是不利的。

本实验中,我们利用大剂量(>85 mg/kg)的 ISO 对大鼠进行皮下注射,造成缺血性心肌损伤动物模型,其病理变化与心肌梗死相似,实验组大鼠在 2 周时即出现显著的心室扩张和心功能下降,与文献[11]报道相符。同时,实验组大鼠心肌 NF-κB 被明显激活,MCP-1 表达明显上调。应用 PDTC 治疗心肌 NF-κB 的激活被明显抑制,进而心肌 MCP-1 mRNA 表达及血清 MCP-1 水平显著下调,同时心肌炎症反应明显减轻,心肌细胞损伤范围明显减小;在实验第 14 天,治疗组 LVESD 较实验组减小,EF 优于实验组,说明 PDTC 对 ISO 所致大鼠缺血性心肌损伤后的心室扩张、心衰发生起到了一定的防治作用。但同时我们也观察到了治疗组肉芽组织替代受损心肌组织延迟的现象,而这可能是有害的[10]。综上所述,我们认为可以得出如下结论:应用 PDTC 能够对心肌缺血性损伤后的心室扩张、心功能损害起到一定的防治作用,该作用可能主要得益于在心肌损伤急性期对心肌细胞的保护作用,其机制可能与抑制 NF-κB 的激活进而下调 MCP-1 的表达、减轻心肌炎症损伤有关。

参考文献:

[1] Gupta S, Young D, Sen S. Inhibition of NF-kappaB 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] 李红莉, 刘　滨, 刘　阳, 等. PDTC 对大鼠阿霉素心肌病的防治作用观察[J]. 中国地方病学杂志, 2005, 24(1): 41 - 43.

[3] Gan R T, Li W M, Xiu C H, *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] Frangogiannis N G, Smith C W, Entman M L. The inflammatory response in myocardial infarction[J]. Cardiovasc Res, 2002, 53(1): 31 - 47.

[5] Gerard C, Rollins B J. Chemokines and disease[J]. Nat Immunol, 2001, 2(2): 108 - 115.

[6] Frangogiannis N G, Entman M L. Chemokines in myocardial ischemia[J]. Trends Cardiovasc Med, 2005, 15(5): 163 - 169.

[7] Ueda A, Okuda K, Ohno S, *et al*. NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene[J]. J Immunol, 1994, 153(5): 2052 - 2063.

[8] Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, *et al*. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction[J]. Circulation, 2003, 108(17): 2134 - 2140.

[9] Zachariae C O, Anderson A O, Thompson H L, *et al*. Properties of monocyte chemotactic and activating factor (MCAF) purified from a human fibrosarcoma cell line[J]. J Exp Med, 1990, 171(6): 2177 - 2182.

[10] Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, *et al*. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts[J]. Circ Res, 2005, 96(8): 881 - 889.

[11] 李为民, 田　颖, 孔一慧, 等. 异丙基肾上腺素致大鼠心力衰竭模型的实验研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2003, 37(5): 386 - 388.

(编辑　张　维)