论著

DOI: 10.16016/j.1000-5404.201408072

硫化氢对糖尿病大鼠心肌纤维化及 NF-κB p65 和 TNF-α 表达的影响

吴志雄,罗 健,李 芳,肖 婷,周松柏,杨 军 (421001 湖南 衡阳,南华大学附属第一医院心血管内科)

[摘要] **目的** 探讨气体信号分子硫化氢(H_2S)对糖尿病大鼠心肌纤维化以及 TNF-α 和 NF-κB p65 表达的影响。**方法** 将 30 只雄性成年 SD 大鼠分为 3 组:对照组(Control 组)、糖尿病大鼠组(STZ 组)、硫化氢干预糖尿病大鼠组(STZ + H_2S 组),每组 10 只。用腹腔注射链脲佐菌素(STZ,40 mg/kg)建立糖尿病模型;Control 组每天腹腔注射生理盐水;STZ + H_2S 组每天腹腔注射硫氢化钠(H_2S 供体)溶液(100 μmol/kg),8 周后处死大鼠,HE 染色观察心肌组织病理学变化;Western blot 检测Ⅳ型胶原蛋白和 NF-κB p65 和 TNF-α 的表达。**结果** 与 STZ 组相比,H_2S 干预后的心肌细胞间质纤维化明显改善,而与 Control 组相比,STZ 组的Ⅳ型胶原及 TNF-α 和 NF-κB p65 蛋白的表达明显增加($P<0.05$);与 STZ 组相比,STZ + H_2S 组Ⅳ型胶原及 TNF-α 和 NF-κB p65 蛋白的表达则明显减少($P<0.05$)。**结论** H_2S 改善糖尿病大鼠心肌纤维化,抑制 NF-κB/TNF-α 的信号通路是其可能机制之一。

[关键词] 硫化氢;糖尿病;心脏重构;NF-κB p65;TNF-α;Ⅳ型胶原蛋白

[中图法分类号] R362;R541.8;R587.2 [文献标志码] A

Effects of hydrogen sulfide on myocardial fibrosis and expression of TNF-α and NF-κB p65 in diabetic rats

Wu Zhixiong, Luo Jian, Li Fang, Xiao Ting, Zhou Songbai, Yang Jun (Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of South China University, Hengyang, Hunan Province, 421001, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of hydrogen sulfide (H_2S) on the myocardial fibrosis and the myocardial expression of nuclear factor-κB p65 (NF-κB p65) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in diabetic rats. **Methods** Thirty male adult rats were randomly divided into 3 groups: a control group, a diabetes mellitus group [streptozotocin (STZ) group], and a diabetes mellitus treated with H_2S group (STZ + H_2S group). The diabetic rat model was established by intraperitoneal injection (i.p.) of STZ at 40 mg/kg. The control group was treated with normal saline every day (i.p.), and NaHS (100 μmol/kg, i.p.) as H_2S donor was administered to the rats of the STZ + H_2S group. After 8 weeks, the pathologically morphological changes of myocardial fibers were analyzed by HE staining, and the expression of type Ⅳ collagen, NF-κB p65 and TNF-α was analyzed by Western blotting. **Results** Compared with the STZ group, the interstitial fibrosis of myocardial cells was obviously alleviated after H_2S intervention in the STZ + H_2S group. Compared with the control group, the expression of type Ⅳ collagen, NF-κB p65 and TNF-α was significantly increased in the STZ group ($P<0.05$). However, H_2S treatment reversed the STZ-induced up-regulation of type Ⅳ collagen, NF-κB p65 and TNF-α in the STZ + H_2S group. **Conclusion** H_2S alleviates myocardial fibrosis in the diabetic rats through inhibiting the NF-κB p65 and TNF-α signaling pathway.

[基金项目] 国家自然科学基金(81202830)

[通信作者] 杨 军,E-mail:yangjunincn@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141208.1420.014.html(2014-12-08)

[**Key words**] H_2S; diabetes mellitus; cardiac remodeling; NF-κB p65; TNF-α; type Ⅳ collagen

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81202830), Corresponding author: Yang Jun, E-mail: yangjunincn@163.com

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DC)是一种独立的糖尿病心血管并发症,其发病机制十分复杂,至今仍未完全阐明[1],有研究报道其发生、发展与心肌纤维化密切相关。目前研究认为糖尿病时高血糖可通过多种途径激活机体的炎症反应是导致糖尿病心肌纤维化的主要原因[2-3]。TNF-α是参与炎症反应的重要炎症因子,而NF-κB是细胞内参与炎症反应调控的一种重要的核转录因子,并参与了众多免疫和炎症反应有关的炎症性细胞因子,包括TNF-α的转录和表达[4]。

硫化氢(H_2S)作为一种新发现的第3种气体信号分子,已有研究发现其在心血管疾病中具有重要的保护作用。而H_2S是否参与糖尿病心肌纤维化以及内在调控机制,目前仍不清楚[5-8]。本实验拟通过建立糖尿病大鼠模型,观察气体信号分子H_2S对糖尿病大鼠心肌纤维化以及TNF-α和NF-κB p65表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

30只成年雄性SD大鼠(体质量280~320 g),购自南华大学实验动物中心;动物饲养于恒温(23±1)℃的环境中,白天黑夜各12 h;实验动物均可自由获得水和食物。

1.2 主要实验试剂

硫氢化钠(H_2S供体)购于美国Sigma公司;兔源NF-κB p65和TNF-α一抗、兔源Ⅳ型胶原蛋白购于中国博士德公司;抗兔二抗购于美国Proteintech公司;BCA蛋白定量试剂盒、细胞裂解液购于碧云天公司。

1.3 实验分组及糖尿病模型建立

先饲养SD大鼠1周,让其适应环境;将SD大鼠分为3组:对照组(Control组)、糖尿病大鼠组(STZ组)、硫化氢干预糖尿病大鼠组(STZ+H_2S组),每组10只。STZ组与STZ+H_2S组大鼠按体质量(40 mg/kg)腹腔注射STZ。注射后的24 h,为防止大鼠发生低血糖休克,给予5%的葡萄糖水;注射72 h后,尾静脉采血测血糖,血糖>16.7 mmol/L提示造模成功。造模成功后,STZ+H_2S组每天腹腔注射以PBS为溶剂的NaHS溶液(100 μmol/kg);Control组和STZ组每天腹腔注射等量的生理盐水,持续8周。

1.4 HE染色观察心肌病理学改变

取3组大鼠左心室心肌组织,多聚甲醛固定24 h后,常规石蜡包埋、切片,HE染色观察。

1.5 Western blot检测Ⅳ型胶原蛋白的表达

取3组新鲜大鼠左心室心肌组织,提取蛋白并定量。提取蛋白以SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,湿转法将目的蛋白转至PVDF膜。用TBST配制的5% BSA封闭2 h后,Ⅳ型胶原一抗和GAPDH一抗(稀释度均为1∶400)37 ℃孵育1 h后4 ℃过夜,洗膜后用HRP标记的二抗(稀释度为1∶4 000)37 ℃孵育1 h,洗膜后以ECL显色,曝光后扫描,用Image J图像分析软件进行光密度分析。以GAPDH为内参。

1.6 Western blot检测NF-κB p65和TNF-α蛋白的表达

取3组新鲜大鼠左室心肌组织,提取蛋白,采用BCA比色法进行蛋白定量;SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,湿转法蛋白转膜至PVDF膜。用TBST配制的5% BSA封闭2 h,封闭TNF-α、NF-κB p65和GAPDH一抗(稀释度均为1∶400),37 ℃孵育1 h后4 ℃过夜,用TBST洗膜;用HRP标记的二抗(稀释度为1∶2 000)37 ℃孵育1 h,洗涤和显影后行灰度扫描,以目的条带与GAPDH的灰度比值分别表示NF-κB p65和TNF-α的蛋白表达水平。

1.7 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,各组间比较行单因素方差分析法。

2 结果

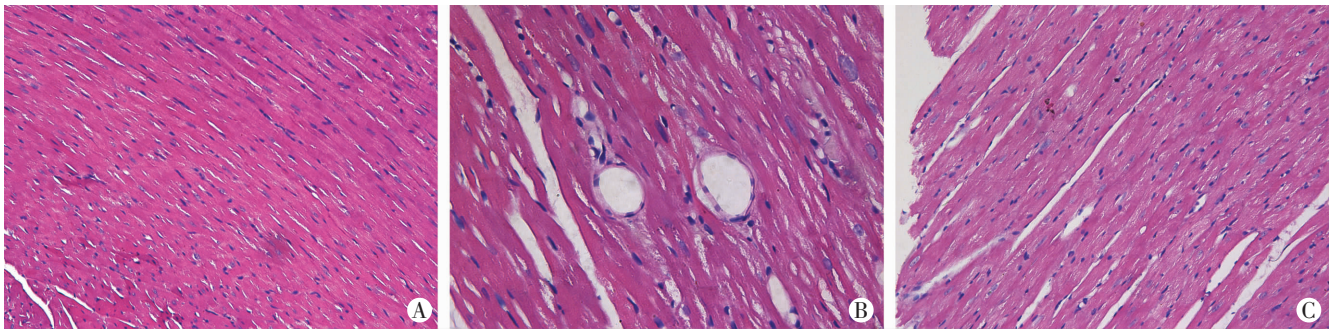
整个实验过程中有3只大鼠死亡,其中STZ组1只,STZ+H_2S组2只,死亡原因可能是血糖过高或者其他糖尿病并发症。

2.1 3组大鼠病理变化的观察

Control组大鼠心肌纤维排列整齐,纤维结构清晰,细胞间隙正常;STZ组大鼠心肌纤维排列紊乱、松散,心肌细胞间隙增宽,心肌细胞间可见呈堆积状分布的胶原纤维;STZ+H_2S组间质纤维化有明显改善,心肌细胞排列趋于整齐,间质有少量疏松结缔组织,且较STZ组明显减少(图1)。

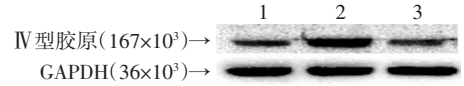
2.2 硫化氢对Ⅳ型胶原纤维表达的影响

Western blot检测3组大鼠Ⅳ型胶原纤维表达,结果显示,与Control组比较,STZ组大鼠心肌组织Ⅳ型胶原表达明显升高($P<0.05$),STZ+H_2S组大鼠心肌Ⅳ型胶原表达与STZ组比较明显减少($P<0.05$)。与Control组相比,STZ+H_2S组Ⅳ型胶原表达无明显差异($P>0.05$,图2,表1)。



A:Control 组;B:STZ 组;C:STZ + H_2S 组

图1 3组大鼠心肌组织病理形态学改变 (HE ×400)



1: Control 组;2: STZ 组; 3: STZ + H_2S 组

图2 Western blot 检测硫化氢对Ⅳ型胶原蛋白表达的影响

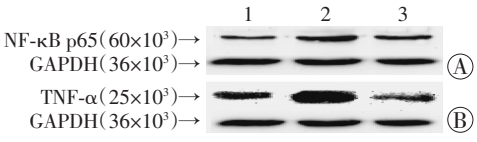
表1 糖尿病大鼠Ⅳ型胶原、NF-κB p65 和 TNF-α 的变化及 H_2S 对其的影响 ($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	Ⅳ型胶原	NF-κB p65	TNF-α
Control 组	0.714 ± 0.024	0.550 ± 0.029	0.709 ± 0.120
STZ 组	0.996 ± 0.055[a]	0.955 ± 0.064[a]	1.232 ± 0.135[a]
STZ + H_2S 组	0.705 ± 0.032[b]	0.736 ± 0.053[b]	0.663 ± 0.136[b]

a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 STZ 组比较

2.3 硫化氢对 NF-κB p65 和 TNF-α 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示,与 Control 组相比,STZ 组大鼠心肌组织中 NF-κB p65 和 TNF-α 蛋白表达水平均明显上调($P<0.05$);而与 STZ 组相比,STZ + H_2S 组大鼠心肌组织 NF-κB p65 和 TNF-α 表达水平均明显下降($P<0.05$)。STZ + H_2S 组与 Control 组相比,心肌 NF-κB p65 和 TNF-α 表达水平无明显改变($P>0.05$,图3,表1)。



1: Control 组;2: STZ 组; 3: STZ + H_2S 组

图3 Western blot 检测检测 H_2S 对 NF-κB p65(A)和 TNF-α(B)蛋白表达的影响

3 讨论

DC 是一种特异性心肌病,是排除了高血压、冠心病及其他已知疾病所致的心肌损伤而独立存在的病理状态,其病理表现为心肌细胞肥大、凋亡以及心肌间质纤维化等。有研究显示,高血糖等导致的炎症反应在糖尿病心肌纤维化过程中具有重要作用,高血糖诱导的促炎细胞因子对心肌纤维化的启动和进展起着十分重要的作用[9-10]。

而 TNF-α 是其中重要的促炎细胞因子,作为激活细胞级联反应的主要介质,在细胞因子网络中发挥关键作用。TNF-α 可通过促进心脏成纤维细胞增殖、增强基质金属蛋白酶活性、诱导氧化应激、诱导心肌细胞凋亡和调节细胞外基质的合成等多种途径参与心肌纤维化的发生和发展。NF-κB 是调控多种基因转录的关键因子,活化后能调控包括 TNF-α 在内的多种炎症介质的转录。NF-κB 作为炎性反应的整合者,在免疫调节和炎症发生过程中具有重要作用。NF-κB 是炎症反应链的"基因开关",它参与许多细胞因子的表达调控[11]。激活的 NF-κB 可启动下游基因的转录,导致包括 TNF-α 在内的炎症因子的过度表达[12]。而 TNF-α 基因启动子区也含有 NF-κB 结合位点,炎症反应时包括 TNF-α 可激活 NF-κB,并可转入核内进一步调控包括 TNF-α 在内细胞因子多种基因转录。如此循环,导致级联放大作用[13]。糖尿病时晚期糖化终产物、蛋白质的非酶糖化和氧化应激产生的活性氧和活性氮以及其特异性受体结合等也都可以激活 NF-κB。本研究结果显示,糖尿病大鼠心肌存在明显心肌纤维化,Ⅳ型胶原蛋白的表达也明显增加,而同时心肌组织中 TNF-α 和 NF-κB p65 的蛋白表达也明显上调,提示糖尿病大鼠心肌纤维化与 NF-κB/TNF-α 通路的激活有关。

而 H_2S 是继 NO 和 CO 后的新发现的第3种内源性气体信号分子[14-15]。内源性 H_2S 具有舒张血管平滑肌、降低血压、抑制心肌细胞凋亡、抑制血管平滑肌细胞增殖等多种生物学效应[14]。本实验结果显示,糖

尿病大鼠存在明显的心肌纤维化，而 H_2S 干预后，糖尿病大鼠心肌纤维化程度明显减轻，且Ⅳ型胶原表达明显减少，提示 H_2S 作为信号分子可能参与糖尿病心肌病的发生、发展过程，而 H_2S 的干预可改善糖尿病大鼠心肌纤维化，但 H_2S 改善心肌病变的机制尚不完全清楚。本研究表明，H_2S 改善糖尿病大鼠心肌纤维化的同时，心肌组织中 TNF-α、NF-κB p65 蛋白的表达也显著下降，提示 H_2S 可能通过抑制炎症反应和 NF-κB/TNF-α 信号通路而改善糖尿病大鼠心肌纤维化。而在其他学者的研究中也发现 H_2S 可通过 NF-κB p65 抑制 TNF-α 导致的炎症反应[16]。而 H_2S 通过 NF-κB/TNF-α 信号通路改善糖尿病心肌纤维化的具体信号机制和临床意义仍有待深入研究。

参考文献：

[1] Stratmann B, Worms J, Tschoepe D. Diabetic cardiomyopathy/heart failure: news regarding etiology, diagnosis, therapy[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2014, 139(40): 2006-2009.

[2] Malfitano C, Barboza C, Mostarda C, *et al*. Diabetic hyperglycemia attenuates sympathetic dysfunction and oxidative stress after myocardial infarction in rats[J]. Cardiovasc Diabetol, 2014, 13(1): 131.

[3] Mariappan N, Elks C M, Sriramula S, *et al*. NF-kappaB-induced oxidative stress contributes to mitochondrial and cardiac dysfunction in type Ⅱ diabetes[J]. Cardiovasc Res, 2010, 85(3): 473-483.

[4] Valen G, Yan Z Q, Hansson G K. Nuclear factor kappa-B and the heart[J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38(2): 307-314.

[5] Huang J, Wang D, Zheng J, *et al*. Hydrogen sulfide attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis induced by abdominal aortic coarctation in rats[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(4): 923-928.

[6] Xue H, Yuan P, Ni J, *et al*. H_2S inhibits hyperglycemia-induced intrarenal renin-angiotensin system activation *via* attenuation of reactive oxygen species generation[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74366.

[7] El-Seweidy M M, Sadik N A, Shaker O G. Role of sulfurous mineral water and sodium hydrosulfide as potent inhibitors of fibrosis in the heart of diabetic rats[J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 506(1): 48-57.

[8] 沈钦海，秦召敏，于天贵，等. 外源性硫化氢对大鼠肝纤维化的影响[J]. 第三军医大学学报，2012，34(8)：754-757.

[9] Malfitano C, Alba-Loureiro T C, Rodrigues B, *et al*. Hyperglycaemia protects the heart after myocardial infarction: aspects of programmed cell survival and cell death[J]. Eur J Heart Fail, 2010, 12(7): 659-667.

[10] Sheng J, Shim W, Wei H, *et al*. Hydrogen sulphide suppresses human atrial fibroblast proliferation and transformation to myofibroblasts[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(10): 1345-1354.

[11] Wei C, Kim I K, Kumar S, *et al*. NF-kappaB mediated miR-26a regulation in cardiac fibrosis[J]. J Cell Physiol, 2013, 228(7): 1433-1442.

[12] Aragno M, Mastrocola R, Medana C, *et al*. Oxidative stress-dependent impairment of cardiac-specific transcription factors in experimental diabetes[J]. Endocrinology, 2006, 147(12): 5967-5974.

[13] Bradham W S, Moe G, Wendt K A, *et al*. TNF-alpha and myocardial matrix metalloproteinases in heart failure: relationship to LV remodeling[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 282(4): H1288-H1295.

[14] 李钢，杨双强. 硫化氢对大鼠MIRI心肌细胞凋亡的影响及机制研究[J]. 重庆医科大学学报，2011，36(8)：932-936.

[15] 戚韵雯，何选丽，朱丽娟，等. 糖尿病小鼠认知功能及不同时相点硫化氢的表达[J]. 第三军医大学学报，2013，35(24)：2625-2629.

[16] Alshorafa A K H，郭庆，曾凡钦，等. 硫化氢通过核因子-kappa B途径抑制肿瘤坏死因子alpha诱导的角质形成细胞的炎症反应[J]. 重庆医科大学学报，2011，36(10)：1190-1193.

（**收稿**：2014-08-30；**修回**：2014-10-24）

（编辑　栾　嘉）