维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0326-04

缺血预处理和吡那地尔预处理对 NF-κB 的影响及其心肌保护作用

黄 燕,刘兴奎,喻 田,余志豪,王海英

(遵义医学院麻醉教研室,贵州 遵义 563003)

【摘 要】目的:观察缺血预处理和吡那地尔预处理对心肌核转录因子(NF-κB)活性的影响,进一步探讨预处理心肌保护机制。方法:健康日本大耳白兔 80 只随机分为 5 组,分别为空白对照组(C 组)、去极化组(K 组)、缺血预处理组(I 组)、吡那地尔预处理组(P 组)和格列本脲阻断组(G 组)。建立离体心脏 Langendorff 模型,待心率平衡 10min 后全心缺血 40min,复灌 60 min 或 120 min。分别于平衡 10min 和复灌 15min、30min、60min 和 120min 时检测心功能指标;平衡 10min 和复灌 30min 时冠脉流量(CF);平衡 10min、复灌 60min 和 120min 心肌 NF-κBP65 的表达情况。结果:(1)复灌后 I 组和 P 组各项心肌功能和 CF 恢复率均优于 C 组和 K 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(2)复灌后 60 min 和 120min 时,I 组和 P 组心肌细胞胞核 NF-κB P65 平均灰度值高于 C 组和 K 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);G 组心肌细胞胞核 NF-κB P65 平均灰度值较 P 组降低($P<0.05$)。结论:缺血预处理和吡那地尔预处理均能对心肌起到良好地保护作用,其保护机制可能是通过开放 ATP 敏感性钾通道直接或间接抑制 NF-κB 激活,进而减轻心肌缺血再灌注损伤。

【关键词】缺血再灌注损伤;预处理;ATP 敏感性钾通道;核转录因子κ appa B

【中国图书分类法分类号】R654.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-11-26

The influence of preconditioning on the activity of NF-κB and its myocardial protective effects

HUANG Yan, et al

(*Department of Anesthesiology, Zunyi Medical College*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the influence of ischemic and pinacidil preconditioning on the activity of NF-κB and its myocardial protective effects. ***Methods***: Eighty isolated rabbit hearts were randomized into five groups (Group C、K、I、P、G). Hearts were removed and mounted in a Langendorff apparatus perfused with 37℃ oxygenated Krebs-Henselet buffer. All groups were subjected to gobal myocardial ischemia for 40 min and reperfusion for 60 min or 120 min. Cardiac functions were monitored at 10 min equilibration 、15 min、30 min、60 min and 120 min reperfusion; Coronary flow (CF) was measured at 10 min equilibration and 30 min reperfusion; Expression of NF-κB P65 was determined at 10 min equilibration、60 min and 120min reperfusion. ***Results***: (1)After ischemic reperfusion , the recovery of cardiac function and CF in Group I and Group P was significantly superior to that in Group C and Group K ($P<0.01$ or $P<0.05$); (2) The expression of NF-κB P65 in Group I and Group P was greater than that in Group C and Group P; The expression of NF-κB P65 in Group G were higher than that in Group P ($P<0.05$). ***Conclusion***: Both ischemic and pinacidil preconditioning can protect myocardium from myocardial inflammation during ischemic reperfusion , the mechanisms of which may be that the opening sensitive potassium channel might have inhibited the activation of NF-κB directly or indirectly.

【Key words】Ischemic/reperfusion injury;Preconditioning;ATP sensitive potassium channel;Nuclear factor-κ appa B

核转录因子(NF-κB)是一种具有多向性调节作用的核转录因子,广泛调控从昆虫到人类的一系列基因的表达,尤其是与免疫反应、应激反应和炎症反应相关的基因;通过它的激活可诱导多种细胞因子、粘附分子、趋化因子、一些蛋白质和酶基因表达[1]。Lic 等发现心肌缺血时 NF-κB 可被快速激活,再灌注时可被进一步激活;NF-κB 是心脏应激反应快速表达基因,转录产生大量细胞因子(TNF

作者介绍:黄 燕(1974-),女,研究生,讲师,主要研究方向:心肌保护。

基金项目:贵州省优秀青年科技人才培养基金(2002-0217)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

-α、IL-1、IL-6、IL-8 等）和粘附分子（如 ICAM-1、选择素）等，直接引起血管内皮细胞和心肌细胞损伤[2]。本实验室以往大量的实验研究已证明缺血预处理和吡那地尔预处理均能产生良好的心肌保护效果[3~5]，但就其保护机制与 NF-κB 的关系，尤其 ATP 敏感性钾通道与 NF-κB 的关系国内外尚未见报道。本实验旨在观察缺血预处理和吡那地尔预处理对核转录因子（NF-κB）的影响，进一步探讨预处理心肌保护机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

吡那地尔（pinacidil）和格列本脲（Glibenclamide）均为美国阿里克斯公司产品；NF-κ BP65 多克隆抗体及免疫组化二抗通用试剂盒由美国 Lab Vision 公司提供；其余试剂均为国产分析纯。Langendorff 装置；BL-410 生物机能实验系统和 BI2000 医学图象分析仪（成都泰盟公司）。

1.2 兔离体心脏灌注模型的制备

兔耳缘静脉注射肝素 300Iu/kg，5min 后击头致昏，然后迅速开胸取出心脏，并置入 4℃充氧 K-H 液中，排尽心腔内血液，将与生理机能实验系统相连的探针插入左心室，然后将其连接于 Langendorff 灌注装置上，并将离体心脏置于恒温槽中备用。

1.3 动物分组及实验步骤

健康日本大耳白兔 88 只，其中 80 只随机分为 5 组，分别为空白对照组（C 组）、去极化组（K 组）、缺血预处理组（I 组）、吡那地尔预处理组（P 组）和格列本脲阻断组（G 组），每组 16 只。剩余 8 只作为正常组，在灌注 37℃充氧 K-H 液待心率平衡 10min 后取心肌组织，进行免疫组化检测心肌 NF-κB 表达情况。离体兔心 Langendorff 灌注模型制备完成后，经主动脉根部灌注 37℃充氧 K-H 液（pH 维持在 7.4，灌注压为 66mmHg，灌注速度为 15ml/min）。待心率平衡 10min 后：其中 I 组先行 3 次缺血 5min 和复灌 5min 的缺血预处理，P 组先灌注充氧 pinacidil 30min 行药物预处理，G 组灌注充氧 Glibenclamide 10min 后行 30min 行药物（pinacidil）预处理。随后各组灌注停跳液（其中 C 组灌注 4℃无氧 K-H 液；K 组、I 组、P 组和 G 组均灌注 4℃st-Thomas Ⅱ停跳液）建立全心缺血 40min，调节恒温装置使心脏停跳期间其周围温度保持在 28~30℃；随后用 37℃充氧 K-H 液复灌，每组中 8 只常温复灌 60 min，8 只复灌 120 min。

1.4 指标观察

分别于平衡 10min 和复灌 15min、30min、60min 和 120min 时用 BL410 生物机能监测仪测定记录心率（HR）、左室收缩压（LVSP）、左室舒张末压（LVEDP）和左室内压最大上升速率（+dp/dtmax）；各实验组在平衡 10min 和复灌 30min 时收集 3min 的冠脉流出液计算 CF（ml/min）；各实验组分别于平衡 10min、复灌 60 min 和 120min 时取左心室前壁心肌组织置于 10%甲醛溶液中固定，制成石蜡切片。采用 SABC 免疫组化法染色，DAB 显色。空白对照组以 PBS 替代多抗。黄染者为阳性，并观察着色部位。细胞核阳性者表示存在核移位。显微镜下观察并摄像，应用图象分析系统行 NF-κ BP65 表达的定量分析：放大 400 倍，每张切片随机取 10 个细胞进行图像分析，求出每张切片的细胞核平均灰度值。

1.5 统计学处理

全部数据资料分析均采用 SPSS 11.0 统计分析软件进行，以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。资料组间采用单因素方差分析，q 检验；组内采用 t 检验，检验水准 $\alpha=0.05$，$P<0.05$ 为差异有显著性，$P<0.01$ 为有非常显著性差异。

2 结 果

2.1 心肌功能的比较

缺血预处理组和吡那地尔预处理组的心肌护效果明显优于去极化组和对照组，见表 1。

2.2 CF 恢复率的比较

复灌 30min 时，I 组和 P 组的冠脉流量恢复率明显高于 C 组和 K 组，有非常显著性差异（$P<0.01$）；G 组的冠脉流量恢复率明显低于 P 组（$P<0.01$），见表 2。

表 2 五组 CF 恢复率的比较（$\bar{x}\pm s$，$n=16$）

项目	组别	平衡 10min	复灌 30min
CF 恢复率（%）	C组	100	61.24±9.21**
	K组	100	72.64±8.74**##
	I组	100	84.81±9.10*##△△☆
	P组	100	94.12±8.55##△△
	G组	100	70.35±11.97**##☆☆

注：与缺血前相比 *$P<0.05$，**$P<0.01$ 与 C 组相比较 #$P<0.05$，##$P<0.01$；与 K 组相比较 △$P<0.05$，△△$P<0.01$；与 P 组相比较 ☆$P<0.05$，☆$P<0.01$

2.3 心肌细胞 NF-κBP65 表达的比较

复灌 60min 和 120min 时 I 组和 P 组心肌细胞胞核 NF-κ BP65 平均灰度值明显高于 C 组和 K 组，G 组心肌细胞胞核 NF-κ BP65 平均灰度值较 P 组低（注：灰度值与阳性表达强度成反比），且有显著性差异（$P<0.05$），见表 3。

3 讨 论

本实验结果显示：缺血预处理和吡那地尔预处

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 五组心功能指标的比较（$\bar{x}\pm s, n=16$）

项目	组别	平衡 10min	复灌 15min	复灌 30min	复灌 60min	复灌 120min
心率恢复率（%）	C组	100	87.81 ± 12.08	76.03 ± 8.71	64.33 ± 9.44	49.39 ± 11.36
	K组	100	98.91 ± 8.39	89.18 ± 12.18*	75.19 ± 10.95	61.73 ± 12.80
	I组	100	109.66 ± 8.28**	105.20 ± 8.30**△△	93.19 ± 12.93**△△☆	87.77 ± 12.99**△△☆
	P组	100	104.68 ± 11.88**	98.27 ± 7.53**△	81.08 ± 14.14**	71.83 ± 16.24**
	G组	100	97.13 ± 12.19	85.67 ± 11.21*☆	69.98 ± 9.20	61.65 ± 15.46
LVSP恢复率（%）	C组	100	70.95 ± 10.91	52.54 ± 10.47	41.34 ± 9.72	31.21 ± 8.53
	K组	100	84.58 ± 11.83*	72.48 ± 11.15	53.42 ± 12.45	43.91 ± 13.58*
	I组	100	98.02 ± 11.71**	91.74 ± 17.51**△△	83.71 ± 11.37**△△☆	82.55 ± 14.21**△△
	P组	100	91.65 ± 15.83**	85.29 ± 9.16**△	68.53 ± 18.65**△	70.66 ± 13.03**△△
	G组	100	81.41 ± 11.16	67.26 ± 13.35*☆☆	51.17 ± 15.36☆	47.70 ± 9.23*☆☆
LVEDP（mmHg）	C组	4.72 ± 0.92	12.41 ± 5.18	14.08 ± 4.85	19.08 ± 5.15	22.28 ± 4.59
	K组	4.59 ± 0.61	9.16 ± 4.18	10.18 ± 4.29*	15.87 ± 4.21	18.43 ± 3.27
	I组	4.62 ± 0.74	7.69 ± 3.36*	7.98 ± 5.93*	7.65 ± 6.36**△△	6.07 ± 4.93**△△☆
	P组	4.51 ± 1.03	8.30 ± 4.67	8.18 ± 3.27	8.75 ± 3.55**△	10.93 ± 5.78**△△
	G组	4.68 ± 0.59	11.33 ± 5.71	11.37 ± 8.31	14.22 ± 6.14*☆	15.51 ± 2.91*☆
$+dp/dt_{max}$ 恢复率（%）	C组	100	78.78 ± 6.14	61.78 ± 9.08	49.48 ± 9.75	35.68 ± 12.44
	K组	100	90.25 ± 9.24*	77.71 ± 10.38*	60.12 ± 9.27*	51.04 ± 9.41*
	I组	100	88.93 ± 14.09	86.22 ± 11.88**	85.48 ± 8.65**△△☆	75.96 ± 14.55**△△☆
	P组	100	90.03 ± 14.33*	82.81 ± 11.01**	73.35 ± 12.72**△	63.23 ± 12.91**△
	G组	100	88.61 ± 10.70	72.22 ± 13.83	58.19 ± 14.19*	47.13 ± 11.9

注：与 C 组相比较*$P<0.05$,**$P<0.01$;与 K 组相比较△$P<0.05$, △△$P<0.01$;与 P 组相比较☆$P<0.05$,☆☆$P<0.01$

表 3 各组心肌细胞 NF-κBP65 表达的比较（$\bar{x}\pm s, n=16$）

项目	组别	平衡 10min	复灌 60 min	复灌 120 min
NF-κBP65 灰度值	C组		154.54 ± 6.06	135.24 ± 6.42
	K组		156.87 ± 8.21	139.81 ± 7.68
	I组		193.86 ± 16.39**△△☆	178.72 ± 14.46**△△☆
	P组		178.91 ± 15.48*△	164.97 ± 12.29*△
	G组		168.07 ± 15.86*△☆	150.32 ± 12.36*△☆

注：与缺血前相比*$P<0.05$,**$P<0.01$ 与 C 组相比较*$P<0.05$,**$P<0.01$;与 K 组相比较△$P<0.05$, △△$P<0.01$;与 P 组相比较☆$P<0.05$,☆☆$P<0.01$

理的心肌保护作用均优于对照组和去极化组。可能与以下因素有关：(1)预处理能激发机体产生一些内源性保护物质（如腺苷、热休克蛋白、金属硫蛋白等）参与保护缺血的心肌；(2) 预处理能通过开放 ATP 敏感性钾通道减慢 ATP 消耗，减少细胞内 Na^+ 蓄积，减轻酸中毒，防止心肌缺血性痉挛；加快再灌注心肌 Na^+ 平衡的恢复，减少对 Ca^{2+} 的摄取[6,7]；使冠状动脉内皮细胞扩张，增加冠脉流量，给再灌注心肌提供充足的氧，同时冲走缺血期产生的有毒物质（如酸性代谢产物等）。

本实验结果还发现缺血预处理和吡那地尔预处理能抑制心肌细胞 NF-κBP65 激活。以往大量的研究表明 NF-κB 介导缺血再灌注心肌表达炎性介质、参与中性粒细胞的激活和介导心肌细胞的凋亡[8]。这提示我们预处理可能通过抑制 NF-κB 激活，减少炎性介质的表达，抑制中性粒细胞的激活，减少心肌细胞的凋亡，进而减轻心肌缺血再灌注损伤。我们推断预处理抑制 NF-κB 激活可能与以下因素有关：(1)预处理激发心肌轻度氧化应激导致心肌 NF-κB 激活，转录表达细胞保护性蛋白；在随后的 I/R 过程中，这些细胞保护性蛋白反过来通过抑制 NF-κB 激活，减轻或消除由 NF-κB 所介导的

维普资讯 http://www.cqvip.com

心肌损伤[9]；(2) 可能通过降低炎性介质（如 TNF-α）的表达间接抑制 NF-κB 的激活。本实验结果还显示：两预处理组抑制 NF-κB 的激活，可被 ATP 敏感性钾通道阻断剂格列本脲阻断。这提示我们预处理可能通过 ATP 敏感性钾通道开放直接或间接抑制 NF-κB 激活。我们推测可能与 ATP 敏感性钾通道开放保护线粒体功能，减少氧自由基（其是 NF-κB 的激活的主要因素）的产生，进而间接抑制 NF-κB 的激活有关。

本实验发现预处理可能通过开放 ATP 敏感性钾通道直接或间接抑制 NF-κB 的激活，进而减轻心肌缺血再灌注损伤，这可能是预处理心肌保护的一个作用机制。但目前预处理的心肌保护作用机制仍未明确，其与 ATP 敏感性钾通道以及 ATP 敏感性钾通道与 NF-κB 的关系有待于进一步探讨。

（黄燕现工作单位：重庆医科大学附属第二医院麻醉科）

参 考 文 献

[1] Baeuerle PA, Henkel T. Function and activiation of NF-κB in the immune system [J]. Ann Rev immunol, 1994;12:141-179.

[2] Lic, Browder W, Kao Rl. Early activiation of transcription factor NF-κB during ischemia in perfused rat heart [J]. Am J physiol, 1992;276:H543-H552.

[3] 喻 田,余志豪,刘兴奎,等. 缺血预处理对体外循环缺血心肌的保护效果[J]. 中华麻醉学杂志, 1997;17(12):720-724.

[4] Yu Tian, Yu ZhiHao, Liu Xingkui, et al. Myocardial protection with pinacidil induced hyperpolarized arrest during CPB [J]. Chinese Medical Journal, 2001;114(12):1245-1248.

[5] 刘兴奎,喻 田,余志豪等. 吡那地尔预处理和超极化停搏的心肌保护效果研究 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2001;17(4):254-258.

[6] Fukuda H, Luo CS, Gu X, et al. The effect of K (atp) channel activation on myocardial cationic and energetic status during ischemia and reperfusion: role in cardioprotection [J]. J Mol Cell Cardiol, 2001;33(3):545-560.

[7] Ishida H, Hirota Y, Genka C, et al. Opening of mitochondrial K (ATP) channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria [J]. Circ Res, 2001;89(10):856-858.

[8] 汪永义. NF-κB 与心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 国外医学·心血管疾病分册, 2002;29(3):140-142.

[9] Bach FH, Hancock WW, Ferran C. Protective genes expressed in endothelial cells: a regulatory response to injury [J]. Immunol Today, 1997;18(10):483-486.

（上接第 310 页） pathway mediates interleukin-1-induced Sertoli cell proliferation[J]. Cytokine, 2005;32(1):51-59.

[7] Yang H, Mergler S, Sun X, et al. TRPC4 knockdown suppresses epidermal growth factor-induced store-operated channel activation and growth in human corneal epithelial cells [J]. J Biol Chem, 2005;280(37):32230-32237.

[8] Zhang Y, DeWitt DL, McNeely TB, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the production of monocyte prostaglandin H syntase-2, prostaglandin E_2, and matrix metalloprotei-nases [J]. J Chin Invest, 1997;99(5):894-900.

[9] Song X, Zeng L, Jin W, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis [J]. J Exp Med, 1999;190(8):535-542.

[10] Ashcroft GS, Greenwell Wild T, Horan MA, et al. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response[J]. Am J Pathol, 1999;155(10): 1137-1146.

[11] Herrick S, Ashcroft G, Ireland G, et al. Up- regulation of elastase in acute wounds of healthy aged humans and chronic venous leg ulcers are associated with matrix degradation [J]. Lab Invest, 1997;77(9):281-288.

[12] Ashcroft GS, Lei K, Jin W, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing [J]. Nat-Med, 2000;10(6):1147-1153.

[13] Goselink HM, van-Damme J, Hiemstra PS, et al. Colony growth of human hematopoietic progenitor cells in the absence of serum is supported by a proteinase inhibitor identified as antileuko-proteinase [J]. J Exp Med, 1996;184(10):1305-1312.

[14] Kikuchi T, Abe T, Yaekashiwa M, et al. Secretory leukoprotease inhibitor augments hepatocyte growth factor production in human lung fibroblasts [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000;23(9):364-670.

[15] Badinga L, Michel FJ, Simmen RC. Uterine-associated serine protease inhibitors stimulate deoxyribonucleic acid synthesis in porcine endometrial glandular epithelial cells of pregnancy [J]. Biol Reprod, 1999;61(8):380-387.

[16] Zhang XL, Simmen FA, Michel FJ, et al. Increased expression of the Zn-finger transcription factor BTEB1 in human endometrial cells is correlated with distinct cell phenotype, gene expression patterns, and proliferative responsiveness to serum and TGF-beta1 [J]. Mol Cell Endocrinol, 2001;181(1-2):81-96.

[17] Shi CM, Cheng TM, Su YP. Exploring the developmental potential of adult mammalian somatic cells [J]. Chin Sci Bull, 2001;46(1):4-5.