DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.030
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)19-1759-03

论著

NF-κB活化和TNF-α表达在大鼠心肌梗死后心力衰竭中的作用

谢 萍[1],祝善俊[1],祝之明[2] (第三军医大学附属:[1]新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]大坪医院野战外科研究所高血压研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨心肌梗死后(MI)大鼠心肌核因子-κB(NF-κB)活化、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)表达在心室重塑和心力衰竭(心衰)进展中的作用。方法 结扎大鼠冠状动脉前降支复制MI模型,同时设假手术组(SH组),4、8、12周后检测血流动力学指标,称取心脏组织湿重。对左室非梗死区心肌组织采用Western-blot法检测TNF-α蛋白表达,电泳动度迁徙率法(EMSA)检测NF-κB活性。结果 各时相MI组与同期SH组相比:①MI组左室舒张末压(LVEDP)显著增加($P<0.05$),平均动脉压(MAP)、左心室内压最大上升和下降速率($\pm dp/dt_{max}$)均显著降低($P<0.01$);另外,除MI_{12w}组左室相对重量(LVRW)外,其余组LVRW、右室相对重量(RVRW)均明显增加($P<0.05$)。②MI组心肌TNF-α蛋白表达均显著增加,呈时间依赖性,与心功能呈负相关;③MI组心肌NF-κB活性均明显增加。结论 MI后衰竭心肌NF-κB持续激活和炎性细胞因子TNF-α表达增加可能是心室重塑、心衰进行性发展的重要机制之一。

关键词:核因子-κB;肿瘤坏死因子-α;心力衰竭
中图法分类号:R541.602;R392.13 文献标识码:A

Roles of NF-κB activation and TNF-α expression in heart failure following myocardial infarction in rats

XIE Ping, ZHU Shan-jun, ZHU Zhi-ming (Department of Cardiovasology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of nuclear factor-κB (NF-κB) activation and tumor necrosis factor-α (TNF-α) expression on the progressive heart failure following myocardial infarction in rats. **Methods** Male rats were randomized for the proximal left anterior descending branch coronary artery ligation and then killed at 4, 8 and 12 weeks after ligation for the examination of hemodynamic parameters, ventricular mass index, protein expression of TNF-α, and NF-κB activity. Sham-operated rats were used as the control group. **Results** Compared with the sham-operated group, the myocardial infarction rats showed significant decreases in mean arterial pressure (MAP), maximal ascending and descending velocity of the left ventricular pressure ($\pm dp/dt_{max}$) and a significant increase in left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) ($P<0.05$). As compared with those of the sham-operated rats, LVRW and right ventricular relative weight (RVRW), except left ventricular relative weight (LVRW) in MI_{12w} group, increased significantly ($P<0.05$). In comparison with those of the sham-operated group, TNF-α protein production and NF-κB activity increased significantly ($P<0.01$) at 4, 8 and 12 weeks after ligation in noninfarcted myocardium. **Conclusion** Progressively increased TNF-α overexpression and enhanced NF-κB activity in failing myocardium suggest that NF-κB may play an important role in postinfarction ventricular remodeling and progressive heart failure.

Key words: nuclear factor kappa-B; tumor necrosis factor-α; heart failure

目前关于炎性细胞因子在心衰中的作用已引起广泛重视,其中TNF-α是参与心室重塑、心衰进展最为密切的细胞因子之一,还可作为判断心衰疾病程度和预后的指标[1,2]。NF-κB是调节细胞基因转录的关键因子之一,近年研究表明,心肌细胞、内皮细胞以及平滑肌细胞中亦存在NF-κB激活通路,可以调控包括TNF-α在内细胞因子的基因转录,和细胞增殖[3]。本研究通过探讨MI后大鼠心肌NF-κB的活化规律、活化机制及其对TNF-α基因表达的调控,旨在阐明NF-κB活化、TNF-α表达在心室重塑和心衰中的病理意义。

作者简介:谢 萍(1966—),女,四川省简阳县人,博士研究生,主治医师,主要从事心力衰竭发病机制方面的研究。电话:(023)68755701;E-mail:pingxie66@163.com

收稿日期:2003-06-24;修回日期:2003-08-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 实验动物模型的制备与分组

健康Wistar雄性大鼠，体质量(220±20)g(第三军医大学实验动物中心提供)，在乙醚麻醉、人工呼吸及心电监护下，于左侧第四肋间开胸暴露心脏，距左冠状动脉起点2～3 mm处，用7-0丝线结扎左前降支，制成心肌梗死(Myocardial infarction，MI)模型。大鼠清醒后称重，根据观察时相(4、8、12周)不同，随机分为：①MI_{4w}组(n=10)；②MI_{8w}组(n=8)；③MI_{12w}组(n=7)。对假手术组(Sham-operation，SH)大鼠进行同样的手术过程，但不结扎冠状动脉，相应地分为：①SH_{4w}组(n=8)；②SH_{8w}组(n=7)；③SH_{12w}组(n=8)。

1.2 血流动力学参数测定及组织标本留取

用导管法行血流动力学检测，大鼠用10%乌拉坦腹腔注射麻醉(10 mg/kg)，分离右颈总动脉，插入PE-50导管，多导生理记录仪先记录MAP，然后记录LVEDP和+dp/dt_{max}和−dp/dt_{max}。立即取出心脏，用冷生理盐水冲洗，滤纸吸干水分，称取左心室(包括室间隔)及右心室湿量，并分别与体质量相除，计算其相对重量。左室非梗死区心肌组织置于液氮保存。剔除心肌梗死面积<20%大鼠。

1.3 Western-blot法检测心肌TNF-α蛋白表达

提取心肌组织总蛋白，将30 μg蛋白经12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离后，电转法转移至PVDF膜，37 ℃下5%脱脂奶溶液封闭3 h，然后与1∶1 000I抗溶液反应(羊抗鼠TNF-α多克隆抗体，均由Santa Cruz生产)4 h，0.1% Tween-20磷酸缓冲液漂洗后，再与1∶2 000辣根过氧化酶标记的II抗(兔抗羊IgG，中山生物技术公司)37 ℃孵育2 h，洗膜后与NEN化学发光试剂(NEC公司)反应10～30 s，使X线片曝光，常规方法显影定影；凝胶扫描成像系统分析目的条带光密度。

1.4 EMSA检测心肌NF-κB活性

心肌组织核蛋白的提取：按Pierce公司提供的试剂盒说明书进行，采用Bradford法检测提取液蛋白浓度。EMSA：按Roche公司提供的地高辛标记凝胶迁徙试剂盒说明书进行。NF-κB同序寡核苷酸探针序列为5′-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3′；3′-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5′。采用末端转移酶和DIG-11-ddUTP方法标记探针。将10 μg核蛋白与2 μl DIG-标记寡核苷酸结合反应，在6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后，电转法转移至尼龙膜，80 ℃烘烤2 h，然后，封闭液孵育30 min，再与1∶10 000抗体(Ant-Digxigenin-AP)溶液孵育30 min，冲洗缓冲液洗膜后，CSPD化学发光反应10 min，X线片曝光30～60 min，常规方法显影、定影；所得结果经光密度扫描半定量分析。实验中在加入标记探针的同时加入20倍的非标记NF-κB寡核苷酸于反应液中，通过竞争性反应对上述实验特异性进行检测。

1.5 统计学处理

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示，应用SPSS 10.0统计软件进行方差分析、t检验及相关分析。

2 结果

2.1 血流动力学参数与心室重塑指标改变

MI_{4w}、MI_{8w}组左室相对重量(Left ventricular relative weight，LVRW)均明显大于同期SH组(P<0.05)，MI_{12w}组LVRW较相应SH组也有所增加，但无显著性差异(P>0.05)。3个MI组右室相对重量(Right ventricular relative weight，RVRW)均大于同期SH组(P<0.05)；与相应的SH组比较，MI后4周开始LVEDP明显增高，并呈时间依赖性；MAP、+dp/dt_{max}和−dp/dt_{max}均显著降低(P<0.05)，呈进行性下降趋势，见表1。

表1 MI后大鼠心室重塑指标与血流动力学参数的改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of ventricular remodeling indexes and hemodynamic parameters after myocardial infarction in rats($\bar{x}\pm s$)

Group	n	RVRW(mg/g)	LVRW(mg/g)	MAP(mmHg)	LVEDP(mmHg)	+dp/dt_{max}(mmHg/s)	−dp/dt_{max}(mmHg/s)
SH_{4w}	8	0.7±0.03	2.59±0.10	114.7±10.09	3.91±0.82	5 845.06±414.62	4 268.67±469.96
SH_{8w}	7	0.73±0.02	2.45±0.05	106.88±11.3	4.85±1.12	5 963.83±394.76	4 351.15±485.07
SH_{12w}	8	0.65±0.09	2.32±0.02	104.97±9.37	4.1±1.78	6 066.03±435.78	4 301.42±309.6
MI_{4w}	10	0.90±0.04 *	2.84±0.08 **	98.55±9.35 *	9.01±3.37 *	4 708.64±268.85 **	3 639.4±329.27 *
MI_{8w}	8	1.01±0.03 **	2.65±0.05 *	86.8±11.6 **	16.86±3.06 **	4 312.1±265.65 **	3 218.98±329.1 **
MI_{12w}	7	0.97±0.10 **	2.41±0.12	87.9±12.7 **	21.63±3.71 **	4 109.4±270.31 **	3 236.15±298.9 **

MAP：mean arterial pressure；LVEDP：left ventricular end-diastolic pressure. *：P<0.05，**：P<0.01 *vs* SH group

2.2 心肌TNF-α蛋白表达变化及其与心功能的相关性

MI组心肌组织TNF-α蛋白表达较同期SH组明显增加，4周、8周和12周不同时相点分别增加1.65、2.74和3.1倍(P<0.01)，呈进行性增加，见图1。将心肌TNF-α蛋白表达与+dp/dt_{max}和−dp/dt_{max}进行相关分析，结果表明，非梗死区心肌组织TNF-α表达与+dp/dt_{max}(r=−0.59)和−dp/dt_{max}(r=−0.65)均呈负相关。实验例次为3，重复实验结果一致。

2.3 心肌组织NF-κB活性的改变

MI组心肌NF-κB活性SH组均明显增加，4周、8周和12周不同时相点分别增加1.94、2.81和3.45倍，见图2。



图1 心肌组织TNF-α蛋白表达变化(Western-blot)结果

Fig 1 Changes of myocardial TNF-α protein expression

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

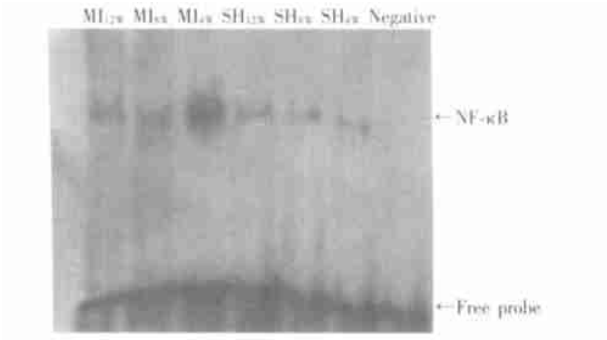


图 2　心肌组织 NF-κB 活性改变(EMSA 结果)

Fig 2　Changes of myocardial NF-κB activity

3　讨论

心室重塑是心衰发生发展的基础, MI 后引起心肌重量、心室容量的增加和形状结构的改变, 导致心室重塑[4]。本研究结果显示, 除 MI_{12w} 组左室肥厚指数以外, MI 后各时相点左、右室重量和肥厚指数均显著增加, 与 SH_{12w} 组相比, MI_{12w} 组左室肥厚指数无显著差异的原因可能与心衰时大鼠体重下降有关, 另外, 也可能与 MI 后心室重塑右室以肥厚为主, 而左室扩张明显有关。同时 MI 后左室收缩、舒张功能均明显减退, 且呈进行性加重。由此表明, MI 后心室重塑与心功能下降两者密切相关。

近年研究认为炎性反应参与心衰的发展过程, 心肌缺血、缺氧可诱导包括 TNF-α 的炎性细胞因子表达, 与炎性反应有关的 NF-κB 可能在心衰病理过程中起重要作用[3,5]。尽管 NF-κB 能在转录水平激活各种炎性细胞因子, 而某些细胞因子如 TNF-α 又可进一步激活 NF-κB, 如此循环, 产生级联放大作用[2,6]。另外, TNF-α 可间接诱导 MMPs 的表达, 同时, NF-κB 还可以直接激活 MMPs 基因, 参与促进基质胶原纤维降解, 心肌纤维化, 最终导致心肌僵硬度增加, 顺应性下降; 如此构成心肌重塑的特征性改变和心功能不全不断加重, 因此, 这一作用对细胞外基质重塑至关重要[7,8]。本实验结果显示, MI 后 4、8 周和 12 周大鼠衰竭心肌 TNF-α 合成明显增高, TNF-α 蛋白水平与 $+dp/dt_{max}$ 和 $-dp/dt_{max}$ 均呈负相关, 且随心功能的恶化及左、右心室相对重量增加, 其表达量增高。提示 TNF-α 与心室重塑和心衰的发生发展密切相关。Ono 等[9]也证实, 大鼠 MI 后 20 周心肌 IL-1β、IL-6 和 TNF-a 表达仍明显增加。

尽管研究表明 NF-κB 调控 TNF-α 的表达, 但对其在心衰发病中的作用目前仍不很清楚。NF-κB 能在转录水平激活各种炎性细胞因子, 而某些细胞因子如 TNF-α 又可进一步激活 NF-κB, 如此循环, 产生级联放大作用[2,6]。本实验研究 MI 后非梗死区心肌 NF-κB 活化与 TNF-α 表达的关系, 获得了支持 NF-κB 通路参与 MI 后心室重塑、心衰进展的实验依据。EMSA 结果显示 MI 后非梗死区心肌 NF-κB 活性明显增加, 呈时间依赖性, 与心功能降低和 TNF-α 表达增加相一致。临床研究表明[10], 利用左室辅助泵(LVAD)治疗终末期心衰患者心功能和心肌重塑得到改善的同时, 心肌 NF-κB 活性也明显降低。从而进一步证明 NF-κB 活化在心衰的发生发展中发挥了一定的作用。

总之, 本研究表明了 MI 后可增强 NF-κB 介导的非梗死区心肌 TNF-α 蛋白合成和基因表达, 结果提示衰竭心肌 NF-κB 持续激活、TNF-α 过度表达引起的心肌炎性激活可能是 MI 后心室重塑、心衰的重要机制之一。

参考文献:

[1] Baig M K, Mahon N, Mckenna W J, *et al*. The pathophysiology of advanced heart failure[J]. Am Heart J, 1998, 135(Suppl): S216—230.

[2] Deswal A, Petersen N J, Feldman A M, *et al*. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone Trial(VEST)[J]. Circulation, 2001, 103(11): 2055—2059.

[3] Valen G, Yan Z Q, Hanson G K. Nuclear factor kappa-B and the heart[J]. J Mol Cell Cardial, 2001, 38(2): 307—314.

[4] Cohn J N, Ferrari R, Sharpe N, *et al*. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 35(3): 569—582.

[5] Haudek S B, Bryant D D, Giroir B P. Differential regulation of myocardial NF-κB following acute or chronic TNF-α exposure[J]. J Mol Cell Cardial, 2001, 33(7): 1263—1271.

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

[7] Li Y Y, Feng Y G, Kadokami T, *et al*. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor alpha can be modulated by anti-tumor necrosis factor alpha therapy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(4): H12746—H12751.

[8] Spinale F G. Matrix metalloproteinases regulation and dysregulation in the failing heart[J]. Circ Res, 2002, 90(2): 520—530.

[9] Ono K, Matsumori A, Shioi T, *et al*. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts possible implication in left ventricular remodeling[J]. Circulation, 1998, 98(3): 149—156.

[10] Grabellus F, Levkau B, Sokoll A, *et al*. Reversible activation of nuclear factor-κB in human end-stage heart failure after left ventricular mechanical support[J]. Cardiovasc Res, 2002, 53(1): 124—130.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net