

• 基础研究 •

心力衰竭大鼠组织中核因子 κ B 的活化与细胞因子的表达

李彦华 王士雯 朱梅

【摘要】 目的 探讨大鼠心力衰竭不同阶段主要脏器细胞因子水平的增高与 NF- κ B 活化之间的关系及细胞因子表达增高的发生机制。方法 结扎冠状动脉前降支方法构建大鼠心肌梗死后心力衰竭模型。在术前、术后 4 周、16 周分别留取心力衰竭失代偿组及假手术组大鼠脏器组织,测定在不同组织中、同一组织心力衰竭不同时期 NF- κ B 活性变化。结果 手术组肺脏内 NF- κ B 的活化水平明显增高,与细胞因子的浓度变化呈正相关,与相应的大鼠心脏功能(主要比较指标为 $\pm dp/dt_{max}$)呈负相关。结论 在大鼠心力衰竭发生过程中存在组织中细胞因子表达增高,且增高的程度与相应组织中 NF- κ B 的活化程度有关。

【关键词】 心力衰竭,充血性;细胞因子类;白细胞介素-6;肿瘤坏死因子- α ;核因子- κ B

Activity of nuclear factor- κ B and cytokines expression in tissues of heart failure rats

LI Yanhua, WANG Shiwen, ZHU Mei

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To explore the relations between cytokines expression levels and activity of nuclear factor(NF- κ B) in different tissue samples of congestive heart failure rat model. Methods Normotensive male Wistar rats weighed (250 \pm 20)g were used. Infarction of the left ventricle (LV) was obtained by ligation of the left descending coronary artery under artificial ventilation. Sham operated rats underwent the same surgical procedure with the exception of coronary ligation. At baseline, and 4 and 16 weeks after coronary ligation, all animals were assessed by echocardiography and cardiac catheterization. According to hemodynamic change, rats were divided into compensated and decompensated groups. Nuclear proteins from the lung, the heart, the liver and the spleen were extracted separately using EMSA to assay the activity of NF- κ B in the tissue samples. Results Compared with other organs, the expression of TNF- α and IL-6 mRNA was significantly increased in the lung of rats with compensated heart failure, which was positively correlated with the activity of NF- κ B, and negatively correlated with heart function of the rats. Conclusion Sustained activation of NF- κ B and elevation of cytokines in chronic heart failure are correlated positively with deteriorated cardiac function. Lung is an important source of synthesis and storage of cytokines at the early stage in an experimental model of heart failure. It is an important organ that contributes to the development and progression of heart failure.

【Key words】 heart failure, congestive; cytokines; interleukin 6; tumor necrosis factor; nuclear factor kappa B

心力衰竭时存在体内细胞因子水平的增高及细胞因子网络的紊乱。在既往的 20 年中,心力衰竭的病理生理机制学说发生了革命性的变化。目前的心力衰竭被认为是一种神经内分泌的异常,而不仅仅是一种循环功能的异常。在循环中神经内分泌细胞

因子水平的增高对预后具有负性作用^[1],尤其是肿瘤坏死因子 α (TNF- α),但应用抗 TNF- α 的治疗没有降低心力衰竭患者的死亡率,甚至会产生负面作用。究其原因可能与细胞因子的产生有其自身复杂的网络调控机制有关。不同细胞因子浓度变化时间、特

收稿日期:2008-06-07

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目“973 课题”(G2000057004)

作者单位:解放军总医院老年心血管病研究所

通讯作者:王士雯, Tel:010-66936761

点和发挥作用的机制也存在差异^[2]。细胞因子水平的增高受多种因素调节,其中核因子(nuclear factor, NF) κ B是调控细胞因子基因转录表达的关键因子之一,启动和调节众多参与炎症反应、免疫反应的基因表达^[3]。笔者通过实验,研究组织 NF- κ B活化与局部组织细胞因子表达之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 材料 健康雄性清洁级 Wistar 大鼠 40 只,体重(250±20)g,随机分为手术组 30 只,假手术组 10 只。在冠状动脉前降支结扎术后 4 周随机选取手术组的 15 只留取血清、超声心动图及血流动力学资料,并处死大鼠,测定心肌梗死面积,将心肌梗死面积>20%、血流动力学检测左室舒张末压力(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP) < 15mmHg 作为心力衰竭代偿期的组织标本,分别应用液氮冻存及 10%中性甲醛固定,用于进一步的实验研究。分别留取假手术组、术后 4 周、16 周大鼠心、肝、脾、肺组织标本,大鼠 LVEDP>15mmHg 作为血流动力学判断心力衰竭的标准^[3],组织标本分为 3 组,即假手术组、心力衰竭代偿组、心力衰竭失代偿组。

1.2 主要药品及试剂 注射用氧哌嗪青霉素钠,速眠新,IL-6, TNF- α ELISA 试剂盒,北京晶美生物工程有限公司(美国 ENDOGEN 公司产品),批内、批间变异系数均<9.5%。IL-6, TNF- α 小鼠抗人的细胞因子抗体,第四军医大学免疫学教研室提供,批内、批间变异系数均<9.5%。NF- κ B 通用型寡核苷酸探针(NF- κ B 序列:5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3')[γ -³²P]ATP(亚辉生物医学工程公司,北京)。NEN 化学发光试剂、PVDF 膜(NEC,美国)。显影胶片(KODAK,日本)。牛血清白蛋白(Sigma)。其余试剂均为国产分析纯。

1.3 主要仪器 RM-6000 型多导生理记录仪,日本光电公司。DH-140B 型小动物呼吸机,浙江医科大学实验仪器厂。心脏急救监护仪,上海医用电子

仪器厂。

1.4 复制动物模型 应用结扎冠状动脉前降支的方法构建大鼠心肌梗死后心力衰竭模型,术后抗感染 3d。假手术组大鼠进行同样的手术过程,但不结扎冠状动脉。术前、术后 4 周、16 周分别行大鼠心脏超声、血流动力学检查,并于大鼠处死前留取相应的血清学标本,-70℃冻存,用于循环中细胞因子的水平检测。

1.5 血流动力学参数测定 术后 4 周对手术组、假手术组大鼠再次行心脏超声检查,并留取相应资料。应用随机数字的方法从手术组 26 只大鼠中抽取 15 只,进行血流动力学检测,测量 LVEDP 等血流动力学指标。

1.6 电泳动度迁移率法(EMSA)检测转录因子核结合活性 配制 EMSA 用液,抽提核蛋白和胞浆蛋白,标记探针, DNA 结合反应。在特异性竞争实验中,同时加入 50 μ l 的未标记探针;在非特异性竞争实验中,同时加入 50 μ l 未标记的其他探针。加入 1 μ l 的已标记探针室温孵育 20min;加入 6 倍上样缓冲液 1.7 μ l,终止反应;制备 4%非变性聚丙烯酰胺凝胶,350V 预电泳 30min;样品 10 000 \times g 离心 10s 后上样,100V 恒压电泳 3h;干胶,-70℃放射自显影 12h;取 X 光片常规方法显影定影,应用凝胶成像系统光密度扫描半定量分析显影带。

1.7 统计方法 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示;计数资料用频数表示,应用 SPSS10.0 软件进行统计分析处理,组间比较采用单因素方差分析,同组间比较用双侧 t 检验,频数及率的比较用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 心脏功能及细胞因子变化 见表 1。

2.2 NF- κ B 的活性变化 见表 2,图 1~4。手术组肺脏内 NF- κ B 的活化水平明显增高,与细胞因子的浓度变化呈正相关,与相应的大鼠心脏功能(主要比较指标为 $\pm dp/dt_{max}$)呈负相关。在大鼠的心力衰竭失代偿期,心脏、肝脏也存在 NF- κ B 的活化,认为 NF- κ B

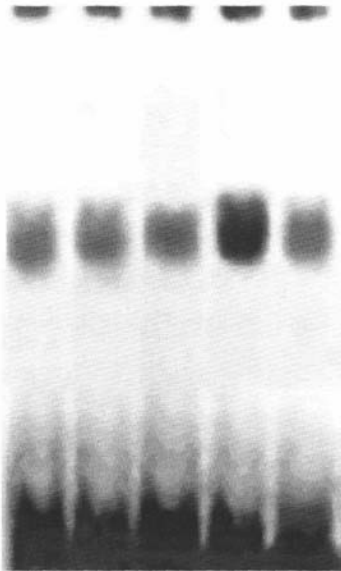
表 1 各组血清细胞因子、射血分数及左室舒张末压

组别	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)	EF(%)	LVEDP (mmHg)
假手术组	0	0	73±7	5.5±0.7
心力衰竭代偿组	0.64±0.25	7.15±2.30	62±9	11.3±4.1
心力衰竭失代偿组	0.17±0.05	8.32±2.63	35±4	20.8±3.4

注:射血分数(EF)<45%为心脏超声判断大鼠心力衰竭的标准,LVEDP>15mmHg 作为血流动力学判断心力衰竭的标准^[3]。

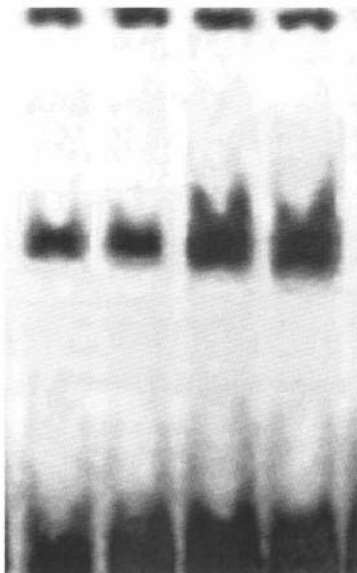
的活化与局部细胞因子的生成增加有关。

图1~4分别为不同的心功能分组大鼠心脏、肺脏、肝脏和脾脏内NF-κB活化EMSA条带结果。



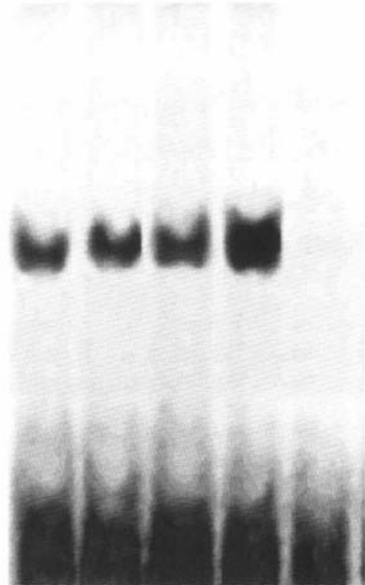
泳道从左到右依次为空白对照、假手术组、心力衰竭代偿组、心力衰竭失代偿组、非特异性竞争对照。上图可见在第4泳道即心力衰竭失代偿组NF-κB核结合活性明显增强,其他组间差异不显著

图1 大鼠心脏NF-κB核结合活性的变化



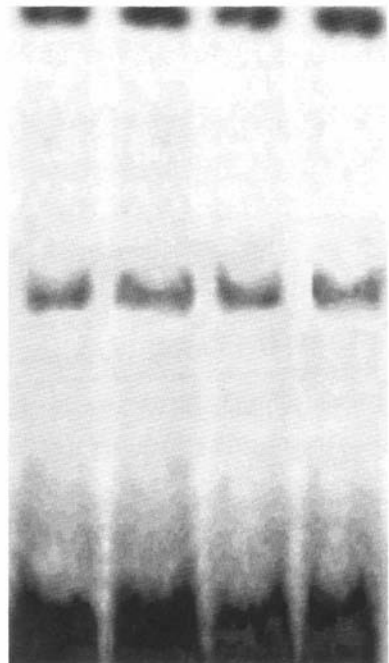
泳道从左到右依次为空白对照、假手术组、心力衰竭代偿组、心力衰竭失代偿组。在心力衰竭代偿组及失代偿组核结合活性均明显增强

图2 大鼠肺脏NF-κB核结合活性的变化



泳道从左到右依次为空白对照、假手术组、心力衰竭代偿组、心力衰竭失代偿组。在第4泳道即心力衰竭失代偿组核结合活性明显增强

图3 大鼠肝脏NF-κB核结合活性的变化



泳道从左到右依次为空白对照、假手术组、心力衰竭代偿组、心力衰竭失代偿组。四条泳道无明显差异,未观察到心力衰竭失代偿组NF-κB核结合活性的明显变化

图4 大鼠脾脏NF-κB核结合活性的变化

表2 心力衰竭大鼠不同脏器 NF- κ B 的活性变化

组别	心	肺	肝	脾
空白对照组	75±6	61±4	81±7	25±2
假手术组	73±9	65±3	85±10	27±9
心力衰竭代偿组	78±7	154±9	83±8	26±5
心力衰竭失代偿组	250±11	110±8	305±16	28±4
非特异性竞争对照组	87±6			

3 讨论

心衰时存在体内神经内分泌的激活及细胞因子网络的紊乱已为人们的共识。大量研究报道, TNF- α 、IL-6 是与心衰的发生关系最为密切的两种细胞因子, 在许多左室功能不全的心脏病中存在上述细胞因子水平的升高, 通过特异性受体, 诱导基因表达、细胞生长及凋亡。细胞因子的表达可以抑制心脏收缩功能, 导致左室重构, 参与心衰的发病及疾病进展^[1]。笔者的实验发现, 在心肌梗死后心力衰竭的动物模型中, 存在 TNF- α 及 IL-6 表达的增高, 升高的水平与 NF- κ B 活化程度有关, 肺组织内 NF- κ B 活化较早, 先于心脏、肝脏、脾脏等其他脏器, 一方面可能与肺循环系统最早受到心功能降低的影响、内皮细胞功能异常有关; 另外, 肺内存在大量的巨噬细胞, 也是细胞因子合成及 NF- κ B 活化的可能原因。从心力衰竭的代偿期逐渐发展至失代偿期, 细胞因子的含量高于假手术组, 并与 NF- κ B 活化水平具有正相关性, 提示细胞因子的生成及活化是通过 NF- κ B 活

化来调控炎性细胞因子的表达^[4]。NF- κ B 是一种对氧化还原敏感的转录因子, 对先天免疫及获得性免疫均有调节作用, 调节着一系列炎性细胞因子基因的表达, NF- κ B 活化诱导炎性细胞因子的表达, 在心力衰竭的发病中发挥着重要的作用^[5]。NF- κ B 活化状态对维持细胞因子的稳态、心功能的稳定具有重要意义^[6]。

参考文献

- [1] Luzzza F, Bruni F, Rizzo F, et al. Pathophysiology of congestive heart failure. *Minerva Cardioangiol*, 2002, 50:209-219.
- [2] Ferreira A. Cytokines in heart failure. *Rev Port Cardiol*, 2004, 23(Suppl 2):II121-II127.
- [3] Valen G, Yan ZQ, Hansson GK. Nuclear factor kappa-B and the heart. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 38: 307-314.
- [4] Jones WK, Brown M, Ren X, et al. NF-kappa B as an integrator of diverse signaling pathways: the heart of myocardial signaling? *Cardiovasc Toxicol*, 2003, 3: 229-254.
- [5] Frantz S, Fraccarollo D, Wagner H, et al. Sustained activation of nuclear factor kappa B and activator protein 1 in chronic heart failure. *Cardiovasc Res*, 2003, 57: 749-756.
- [6] Bergmann MW, Loser P, Dietz R, et al. Effect of NF-kappa B inhibition on TNF-alpha-induced apoptosis and downstream pathways in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33: 1223-1232.

(上接第 447 页)

of 1993 PTCA guidelines; a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice guidelines (committee to revise the 1993 guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty). *Circulation*, 2001, 103: 3019-3041.

- [2] Cleland JG, Pennell DJ, Ray SG, et al. myocardial viability as a determinant of the ejection fraction response to carvedilol in patients with heart failure (CHRISTMAS trial): randomized controlled trial. *Lancet*,

2003, 362: 14-21.

- [3] Camici PG, Prasad SK, Rimoldi OE. Stunning, hibernation, and assessment of myocardial viability. *Circulation*, 2008, 117: 103-114.
- [4] Huang BS, Ahmad M, Tan J, et al. Sympathetic hyperactivity and cardiac dysfunction post-MI; different impact of specific CNS versus general AT₁ receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 43:479-486.