

• 基础研究 •

PDTC 对大鼠心肌梗死后 NF- κ B 与 MMP-2 表达及心肌胶原重塑的影响陈章荣¹, 吴新华^{1△}, 罗开良², 何 泉³, 杨 璘¹, 向玉鸾¹, 王小平¹

(1. 大理学院附属医院心内科, 云南大理 671000; 2. 重庆医科大学第二附属医院心内科 400010;

3. 重庆医科大学第一附属医院心内科 400016)

摘要:目的 探讨二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)对大鼠心肌梗死后核转录因子 κ B(NF- κ B)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的表达及胶原重塑的影响。方法 制作大鼠心肌梗死模型,分为 PDTC 干预(PD)组和心肌梗死对照(MI)组,另设假手术(SH)组,每组大鼠 6 只。PD 组于术后 24 h 腹腔注射 PDTC 80 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹,连续给药 28 d 后行超声心动图检查评定心功能,处死动物,计算总胶原、I 型胶原、III 型胶原含量和梗死面积,实时荧光定量逆转录聚合酶链反应和免疫印迹法分别检测 NF- κ Bp65 及 MMP-2 的 mRNA 和蛋白质表达量。结果 与 SH 组比较,MI 组和 PD 组的总胶原、I 型胶原、I / III 胶原比值明显增大,NF- κ Bp65 和 MMP-2 的 mRNA 及蛋白质表达量明显增加,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。与 MI 组比较,PD 组总胶原、I 型胶原、I / III 胶原比值改变明显减轻,NF- κ Bp65 和 MMP-2 的 mRNA 及蛋白质表达量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 PDTC 在一定程度上能改善大鼠心肌梗死后心肌胶原重塑,其机制可能与抑制 NF- κ B 激活,下调基质金属蛋白酶(如 MMP-2)表达有关。

关键词:心肌梗死;心肌重塑;二硫代氨基甲酸吡咯烷;核转录因子 κ B;基质金属蛋白酶-2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.25.020

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)25-3004-04

Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on expression of NF- κ B, MMP-2 and collagen remodeling after myocardial infarction in rats

Chen Zhangrong¹, Wu Xinhua^{1△}, Luo Kailiang², He Quan³, Yang Ying¹, Xiang Yuluan¹, Wang Xiaoping¹

(1. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Dali University, Dali, Yunnan 671000, China;

2. Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

3. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC) on expression of NF- κ B, MMP-2 and left ventricular collagen remodeling following acute myocardial infarction in rats. **Methods** The myocardial infarction model in rat was induced by ligation of left anterior descending coronary artery. 12 adult Sprague-Dawley rats survived 24 h after acute myocardial infarction were randomly divided into the myocardial infarction(MI) group and the PDTC-treated(PD) group. Six rats were designated as sham-operated group(SH group). The PD group was intraperitoneally injected with PDTC(80 mg $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹) for 28 d, the MI group and SH group were given normal saline as control. On 28 d, the cardiac function of left ventricle was measured by echocardiography. The infarct size was evaluated. The total collagen, type I collagen, type III collagen, and I / III collagen ratio were quantified by histomorphometry. The mRNA and protein levels of NF- κ Bp65 and MMP-2 were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and by Western blot, respectively. **Results** Compared with the SH group, the values of the total collagen, type I collagen, type III collagen, and I / III collagen ratio in the MI group and the PD group were significantly increased, the difference had statistical significance ($P < 0.01$). The values of the total collagen, type I collagen, type III collagen, and I / III collagen ratio in the PD group were notably decreased than those in the MI group ($P < 0.01$). Moreover, the mRNA and protein levels of NF- κ Bp65 and MMP-2 in the PD group were lower than those in the MI group, the difference had statistical significance ($P < 0.01$). **Conclusion** Left ventricular collagen remodeling following acute myocardial infarction could be improved by PDTC to some extent, which mechanism could be related with inhibiting NF- κ B activation and down-regulating the expression of MMP-2 in rats.

Key words: myocardial infarction; myocardial remodeling; PDTC; NF- κ B; MMP-2

心肌梗死后胶原含量增多和成分的改变等胶原重塑参与了心衰的发生发展,防治病理性胶原重塑成为研究热点。心肌间质胶原重塑过程受基质金属蛋白酶(MMPs)控制。在MMPs的转录调节中,核转录因子 κ B(NF- κ B)信号通路的激活起重要作用,抑制 NF- κ B 活化有可能改善间质胶原重塑^[1-2]。二硫代氨基甲酸吡咯烷(PDTC)是一种 NF- κ B 抑制剂,其能有效地抑制 NF- κ B 激活^[3]。Kumar 等^[4]用转基因小鼠进行试验发现:PDTC 通过抑制 NF- κ B 活性,减轻细胞外基质沉积,改善了心肌重塑。因此,PDTC 有可能通过抑制 NF-

κ B 活性而改善心肌梗死后间质胶原重塑,本研究将对此进行探讨,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立及给药方法 动物模型制作参照文献[5]的方法,以 3.5%水合氯醛腹腔内注射(10 mL/kg)麻醉,气管插管,经胸骨左缘第 2~4 肋开胸,以左冠状动脉主干为标志,在左心耳下方 2 mm 处进针,6/0 号丝线结扎左前降支,制作心肌梗死模型。心电图观察两个以上肢体导联上出现 ST 段上抬大于或等于 0.2 mV 并伴有对应导联变化,同时肉眼观

结扎区域变白为造模成功。选择造模成功、术后 24 h 仍存活的大鼠,分为心肌梗死对照(MI)组和 PDTC 干预(PD)组。另设假手术(SH)组,在相同冠状动脉部位只穿线不结扎。每组动物均为 6 只,如死亡则补充。PD 组手术后 24 h 给予 PDTC (Calbiochem 公司,美国)80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹腹腔内注射^[6],连续 28 d;MI 组及 SH 组给生理盐水对照。

1.2 超声心动图 术后 28 d 大鼠在处死前均行超声心动图(HP/SONOS 5500 多普勒超声仪,探头频率 4~10 MHz),测定左室舒张末径(LVEDD)、左室舒张末容积(LVEDV)、左室短轴缩短率(FS)、射血分数(EF)。

1.3 标本留取、梗死面积计算、心肌胶原染色及定量分析 处死动物,分离左心室,然后沿左心室长轴分为 3 份,心底部及心尖部用液氮速冻后置-70℃保存用于逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)及蛋白免疫印迹法检测。中间部分切成 3 mm 的薄片,行苦味酸天狼猩红染色。普通光镜下梗死区疤痕组织染成红色为主,非梗死区染成黄色为主。佳能 A530 摄影后用 Image Pro Plus 4.5 软件行图像分析,计算梗死面积^[7]。计算公式:梗死面积=(疤痕内弧长+疤痕外弧长)/(外周长+内周长)×100%。取天狼猩红染色切片在普通显微镜下随机取 5 个视野采集非梗死区图像,用 Image Pro Plus 4.5 图像分析软件测定红色胶原所占组织学面积百分比,取平均值得到总胶原含量。用相同方法在偏振光显微镜下采集非梗死区图像,测定红色和橙黄色的 I 型胶原、绿色的 III 型胶原得到 I、III 型胶原含量,计算 I/III 型胶原比值。

1.4 半定量 RT-PCR 检测 NF-κB 及 MMP-2 表达水平 TR-Izol 法提取大鼠心肌组织总 RNA。引物由上海博尚生物公司合成,各引物序列见表 1。RT-PCR 反应体系为 50 μL,按试剂盒(日本 Toyobo 公司)说明进行操作。

1.5 蛋白免疫印迹法检测 NF-κB 蛋白表达 取大鼠心肌组织,按 RIPA 试剂说明提取心肌总蛋白,BCA-100 测定蛋白含量。取 40 μg 蛋白经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶封闭 1 h 后分别与兔抗鼠 NF-κB、MMP-2、β-actin 抗体(Santa Cruz 公司产品,以 TBS 稀释,浓度分别为 1:750、1:500、1:500)室温孵育 2 h;洗膜后

与二抗(羊抗兔 IgG)室温孵育 1 h 后化学发光显影,凝胶成像系统拍照、扫描分析。

表 1 NF-κB、MMP-2 和 β-actin 的 RT-PCR 引物序列	
基因	引物序列
NF-κB p65(480 bp)	上游 5'-CAG CAC ATC CAG ACA GAC ACC A-3'
	下游 5'-GCT GCT AAA AGA ATC CTC AAA ACC-3'
MMP-2(305 bp)	上游 5'-CTACACCAAGAACTTCCGACTATC-3'
	下游 5'-CCTCGTACACGGCATCAATC-3'
β-actin(219 bp)	上游 5'-CAG CTT CTT CTA GTG CCG TTC C-3'
	下游 5'-GGA GTC AGG TGT TTC TGG TGG AG-3'

1.6 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件统计进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间的比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 超声心动图 与 SH 组相比,MI 组和 PD 组的 LVEDD、LVEDV 显著增加,FS 和 EF 显著降低,差异有统计学意义(*P* < 0.01);与 MI 组相比,MI 组和 PD 组的 LVEDD、LVEDV 显著降低,FS 和 EF 显著增加,差异有统计学意义(*P* < 0.01),见表 2。

2.2 非梗死区胶原含量 心肌梗死面积在 MI 组及 PD 组无显著性差异。与 SH 组比较,MI 组和 PD 组总胶原、I 型胶原、III 型胶原 I/III 比值显著增加,差异均有统计学意义(*P* < 0.01);与 MI 组相比,PD 组的总胶原、I 型胶原、III 型胶原 I/III 比值明显降低,差异有统计学意义(*P* < 0.01),见表 3 和图 1。

2.3 NF-κB 及 MMP-2 mRNA 水平表达 与 SH 组相比,MI 组和 PD 组 NF-κB、MMP-2 的 mRNA 表达量明显增加,差异有统计学意义(*P* < 0.01),与 MI 组相比,PD 组的 mRNA 表达明显降低,差异有统计学意义(*P* < 0.01),结果见表 4 和图 2。

2.4 NF-κB 及 MMP-2 蛋白质水平表达 MI 组和 PD 组 NF-κB、IL-1β 的蛋白质表达量相对于 SH 组明显增加,差异有统计学意义(*P* < 0.01),PD 组与 MI 组相比,其蛋白质表达量明显降低,差异有统计学意义(*P* < 0.01),结果表 5 和图 3。

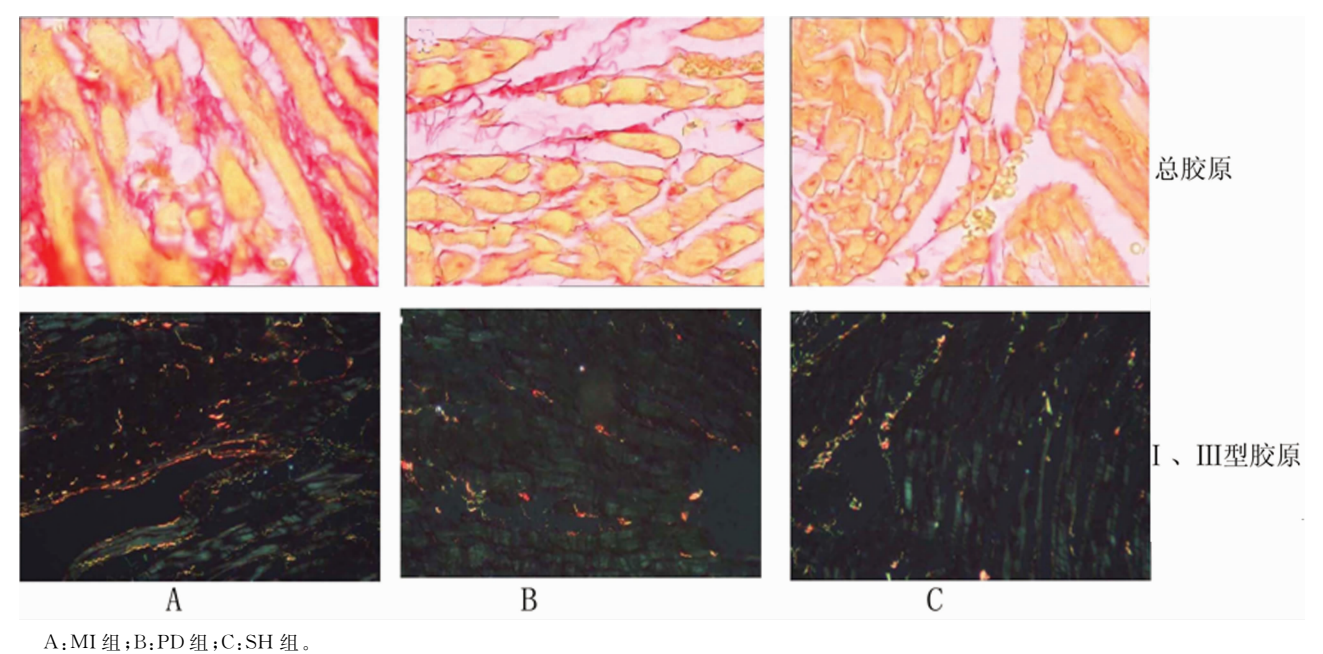


图 1 大鼠非梗死区胶原含量

表 2 各组超声心动图相关指标比较

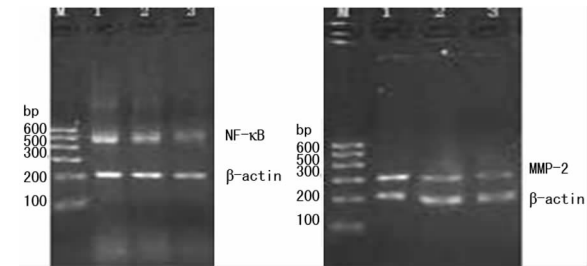
组别	n	LVEDD(mm)	LVEDV(μL)	FS(%)	EF(%)
SH 组	6	5.36±0.42	258.23±15.32	35.65±5.19	64.57±5.26
MI 组	6	7.95±0.43 ^a	523.45±35.24 ^a	20.72±3.64 ^a	31.42±4.32 ^a
PD 组	6	5.86±0.36 ^{ab}	446.43±27.76 ^{ab}	27.39±4.28 ^{ab}	41.31±5.37 ^{ab}

^a:*P*<0.01,与 SH 组比较;^b:*P*<0.01,与 MI 组比较。

表 3 各组胶原含量比较

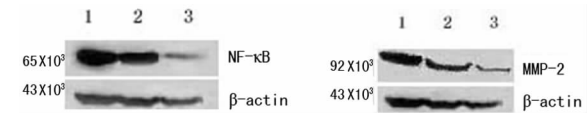
组别	n	总胶原	I 型胶原	Ⅲ型胶原	I / Ⅲ胶原比值	梗死面积
SH 组	6	4.39±0.09	2.75±0.06	1.64±0.05	1.57±0.04	—
MI 组	6	6.29±0.05 ^a	4.36±0.08 ^a	1.89±0.07 ^a	2.38±0.08 ^a	39.52±3.68
PD 组	6	5.24±0.08 ^{ab}	3.37±0.09 ^{ab}	1.77±0.04 ^{ab}	1.90±0.06 ^{ab}	40.16±4.14

^a:*P*<0.01,与 SH 组比较;^b:*P*<0.01,与 MI 组比较,—:表示无数据。



M:标志物;1:MI 组;2:PD 组;3:SH 组。

图 2 大鼠心肌 NF-κB、MMP-2 的 RT-PCR 结果



1:MI 组;2:PD 组;3:SH 组。

图 3 大鼠心肌 NF-κB、MMP-2 的蛋白质表达

表 4 NF-κB、MMP-2 的 mRNA 表达量

组别	n	NF-κB/β-actin	MMP-2/β-actin
SH 组	6	0.72±0.04	0.46±0.03
MI 组	6	1.25±0.05 ^a	1.16±0.04 ^a
PD 组	6	0.88±0.05 ^{ab}	0.68±0.03 ^{ab}

^a:*P*<0.01,与 SH 组比较;^b:*P*<0.01,与 MI 组比较。

表 5 NF-κB、MMP-2 蛋白表达量

组别	n	NF-κB/β-actin	MMP-2/β-actin
SH 组	6	0.45±0.04	0.35±0.03
MI 组	6	2.21±0.06 ^a	1.88±0.04 ^a
PD 组	6	1.36±0.07 ^{ab}	1.12±0.04 ^{ab}

^a:*P*<0.01,与 SH 组比较;^b:*P*<0.01,与 MI 组比较。

3 讨 论

本研究中超声心动图结果表明 MI 组和 PD 组的 LVEDD 和 LVEDV 较 SH 组增加,FS 和 EF 降低;说明心肌梗死后大鼠心功能指标恶化,大鼠心功能恶化可能与胶原重塑有关。心肌梗死后心肌间质重塑主要胶原沉积,胶原沉积是心肌重塑的重要内容,减少胶原沉积可改善心功能^[8]。胶原重塑表现为总胶原、I 型胶原含量的增多和 I / Ⅲ型胶原比值增加。本研究通过结扎冠状动脉左前降支制作大鼠心肌梗死模型,采用天狼

猩红染色观察心肌非梗死区总胶原、I 型胶原、Ⅲ型胶原的变化。结果显示 MI 组非梗死区总胶原和 I / Ⅲ型胶原比值增多较 SH 组多,说明心肌梗死后发生胶原重塑。I 型胶原含量的增多含量增多增加了心肌僵硬,参与心衰发展。

MMPs 是降解细胞外基质成分的最主要蛋白水解系统,与心肌间质胶原重塑有密切关系^[9-10]。研究表明 MMPs 在心肌梗死发生后即开始激活,并且重塑期间,MMP-2 活性和表达均显著增高^[11]。陈昭喆等^[12]研究也表明,心肌梗死后 MMP-2 表达增加,并与胶原重塑密切相关。本实验中在 MI 组和 PD 组 MMP-2 增加,同样证实了在心肌重塑过程中存在表达 MMPs 增高。在 MMPs 的转录调节中,NF-κB 信号通路的激活起重要作用。本研究发现 MI 组大鼠的 NF-κBp65 的表达在心肌梗死后 4 周就已有增加,最近的研究也证明了心肌梗死后存在 NF-κB 的激活^[13]。Xie 等^[14]研究表明激活的 NF-κB 能直接刺激 MMP-2 表达。本研究中 MI 组 MMP-2 表达增加与 NF-κBp65 变化一致,再次说明 NF-κBp65 调节 MMP-2 表达。

既然心肌梗死后存在 NF-κB 激活,NF-κB 通过促进 MMPs 表达引起胶原重塑是心肌间质重塑的一个重要机制,那么应用 NF-κB 抑制剂有可能通过此途径改善胶原重塑,改善心功能。为此,本研究应用 NF-κB 的特异性抑制剂 PDTC 进行实验,结果显示 PDTC 干预后心肌梗死大鼠的总胶原、I 型胶原、Ⅲ型胶原较 MI 组下降,LVEDD 和 LVEDV 较 MI 组降低,FS 和 EF 增加,说明 PDTC 改善了大鼠心肌梗死后间质重塑,改善了心功能。Kumar 等^[4]用转基因小鼠进行试验发现:PDTC 通过抑制 NF-κB 活性,减轻细胞外基质沉积,改善了心肌重塑。PDTC 抑制 NF-κB 机制为:PDTC 能特异性抑制 NF-κB 亚单位表达或抑制 IκB 的降解,减少 NF-κB 的核转为有关^[15]。本研究中应用 PDTC 后 NF-κB 表达降低,且其下游 MMP-2 表达相应下降,因此推测 PDTC 改善大鼠心肌梗死后间质胶原重塑可能与 PDTC 抑制 NF-κB 活性,下调 MMPs 的表达的表达有关。刘晓黎等^[16]应用 PDTC 通过抑制 NF-κB 活性改善了大鼠的肺血管重塑,降低了肺动脉压。Cau 等^[1]研究表明,在中应用 PDTC 通过抑制,下调 MMP-2 和 MMP-9 表达改善了肾性高血压大鼠的血管重塑,改善了血管功能。

总之,本研究表明 PDTC 通过抑制 NF-κB 激活,降低 MMP-2 表达,改善心肌梗死后间质后重塑,改善心功能,PDTC 治疗心肌梗死可能成为一个新的研究方向。但是,由于心肌梗死后心肌间质重塑的机制较复杂,PDTC 是否具有还有其他通路改善重塑,其安全如何等尚未评价,尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Cau SB,Guimaraes DA,Rizzi E,et al. Pyrrolidine dithiocarbamate down-regulates vascular matrix metalloproteinases and ameliorates vascular dysfunction and remodelling in renovascular hypertension[J]. Br J Pharmacol, 2011, 164(2):372-381.
- [2] Ben-David D, Livne E, Reznick AZ. The involvement of oxidants and NF- κ B in cytokine-induced MMP-9 synthesis by bone marrow-derived osteoprogenitor cells[J]. Inflamm Res, 2012, 61(7):673-688.
- [3] Zhang JJ, Xu ZM, Chang H, et al. yrrrolidine dithiocarbamate attenuates nuclear factor- κ B activation, cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human endometriotic epithelial cells[J]. Gynecol Obstet Invest, 2011, 72(3):163-168.
- [4] Kumar S, Seqqat R, Chgurupati S, et al. Inhibition of nuclear factor κ B regresses cardiac hypertrophy by modulating the expression of extracellular matrix and adhesion molecules[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(1):206-215.
- [5] 刘元生, 陈运贞. 慢性心肌梗死大鼠实验模型[J]. 重庆医科大学学报, 2002, 27(2):153-155.
- [6] Li Y, Ha T, Gao X, et al. NF-kappaB activation is required for the development of cardiac hypertrophy [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(4):1712-1720.
- [7] Delyani JA, Robinson EL, Rudolph AE, et al. Effect of a selective aldosterone receptor antagonist in myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 50(5):647-654.
- [8] Rosano JM, Cheheltani R, Wang B, et al. Targeted Delivery of VEGF after a Myocardial Infarction Reduces Collagen Deposition and Improves cardiac function[J]. Cardiovasc Eng Technol, 2012, 3(2):237-247.
- [9] Aggeli C, Pietri P, Felekos I, et al. Myocardial structure and matrix metalloproteinases[J]. Curr Top Med Chem, 2012, 12(10):1113-1131.
- [10] 杨永健, 张鑫, 朱文玲, 等. 基质金属蛋白酶参与心力衰竭患者心肌细胞外基质的调控[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(24):1693-1696.
- [11] Hojo Y, Ikeda U, Ueno S, et al. Expression Of matrix metalloproteinases in patients with acute myocardial infarction[J]. Jpn Circ J, 2001, 65(2):71-75.
- [12] 陈昭喆, 宋亚辉, 谢秀乐, 等. MMP-2 对大鼠心肌梗死后心肌 II、III 型胶原表达的影响及洛沙坦的干预效应[J]. 重庆医学, 2007, 36(12):1173-1174.
- [13] Gu Y, Wang X. Artemisinin Attenuates Post-Infarct Myocardial Remodeling by Down-Regulating the NF- κ B Pathway[J]. Tohoku J Exp Med, 2012, 227(3):161-170.
- [14] Xie Z, Singh M, Singh K, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta[J]. J Bio Chem, 2004, 279(38):39513-39519.
- [15] Li YQ, Zhang ZX, Xu YJ, et al. N-Acetyl-L-cysteine and pyrrolidine dithiocarbamate inhibited nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages by different mechanisms[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(3):339-346.
- [16] 刘晓黎, 王昌明, 蒋明, 等. 核转录因子- κ B 抑制剂对慢性阻塞性肺疾病气道、肺血管重构的防治作用[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(4):582-584.

(收稿日期:2013-03-15 修回日期:2013-05-21)

(上接第 3003 页)

- [7] 王立生, 潘令嘉, 施理, 等. 苏州市 1 453 名女性血清一氧化氮与高血压关系的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2011, 32(8):4-6.
- [8] 张诗卉, 丁建松, 焦阳, 等. 双歧杆菌的完整肽聚糖对 LPS 激活裸鼠腹腔巨噬细胞的影响[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20(1):760-763.
- [9] Hall CN, Garthwaite J. What is the real physiological NO concentration in vivo[J]. Nitric Oxide, 2009, 21(2):92-103.
- [10] Sun J, Zhang XJ, Broderick M, et al. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess Reaction assay[J]. Sensors, 2003, 3(8):276-284.
- [11] Bryan NS, Grisham MB. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples[J]. Free Radic Bioc Biol Med, 2007, 43(5):645-657.
- [12] 杜富滢, 黄卫华, 吴文展, 等. 新型微盘传感器的研制及用于单细胞释放 NO 监测[J]. 高等学校化学学报, 2007, 28(6):1069-1071.
- [13] 陈静, 胡文成, 杜凯, 等. 纳米多孔金属的制备方法研究进展[J]. 材料导报, 2010, 24(16):24-27.
- [14] Cha W, Meyerhoff ME. Enhancing the selectivity of amperometric nitric oxide sensor over ammonia and nitrite by modifying gas-permeable membrane with teflon AF [J]. Chem Analityczna, 2006, 51(6):36-44.
- [15] Kamei K, Mie M, Yanagida Y, et al. Construction and use of an electrochemical NO sensor in a cell-based assessing system [J]. Sensors and Actuators B, 2004, 99(1):106-112.

(收稿日期:2013-03-10 修回日期:2013-05-17)