

在体大鼠心肌缺血再灌注损伤中 NF- κ Bp65 与 Ang II 的关系杨锐¹, 王芬珍^{2Δ}

(1. 浙江省宁波市第一医院心血管内科 315000; 2. 福建省福州市心血管病研究所 350009)

摘要:目的 初步探讨心肌缺血再灌注损伤(IRI)过程中 NF- κ Bp65 与血管紧张素 II (Ang II) 的关系。方法 建立在体大鼠心肌 IRI 模型。以缺血 30 min 再灌注 60 min(I_{30 min}R_{60 min})为观察点,采用随机数字表法分为 IR 组(即 I_{30 min}R_{60 min}后不再经任何处理)、PDTC 预处理组、咪达普利预处理组、PDTC 与咪达普利联合预处理组。分别通过酶联免疫吸附试验(ELISA)及放射免疫分析法检测 NF- κ Bp65 活性及血浆和心肌组织中的 Ang II 含量。通过析因分析观察 NF- κ Bp65 与 Ang II 的相关性。结果 各药物预处理组与 IR 组比均可抑制 NF- κ Bp65 活性及血浆和心肌组织中的 Ang II 含量,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 心肌缺血再灌注损伤过程中 NF- κ Bp65 与 Ang II 相互激活,形成正反馈,共同加重此损伤病理过程。

关键词:再灌注损伤;NF- κ B;血管紧张素 II;吡咯烷二硫基甲酰胺;咪达普利

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.15.027

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)15-1901-03

Studies on interaction between NF- κ Bp65 and Ang II during myocardial ischemia-reperfusion injury in ratsYang Rui¹, Wang Fenzen^{2Δ}

(1. Department of Cardiovascular Medicine, Ningbo No. 1 Hospital, Ningbo, Zhejiang 315000, China;

2. Fuzhou Institute of Cardiovascular Diseases, Fuzhou, Fujian 350009, China)

Abstract: Objective Utilizing the characters of pyrrolidine dithiocarbamate known as a specific inhibitor of NF- κ B and imidapril known as a specific inhibitor of angiotensin converting enzyme, this study was to initially investigate the relationship between NF- κ Bp65 and Ang II during the process of myocardial ischemia reperfusion injury. **Methods** Rat models of myocardial ischemia reperfusion injury were successfully established. The observation point is 60 min of reperfusion after 30 min(I_{30 min}R_{60 min}) ischemia, the DNA activate of NF- κ Bp65 was detected by ELISA; the content of Ang II in blood plasma and cardiac were determined by radioimmunoassay. We pretreated with pyrrolidine dithiocarbamate, imidapril, and both of them to observe changes of the same indexes. **Results** Compared with I_{30 min}R_{60 min}, Pyrrolidine dithiocarbamate, Imidapril and pyrrolidine dithiocarbamate add imidapril could all obviously inhibit NF- κ Bp65 activation and depress the content of Ang II in blood plasm and cardiac, the pyrrolidine dithiocarbamate add imidapril was most obviously. **Conclusion** During the process of myocardial ischemia-reperfusion injury, NF- κ Bp65 had been activated, and the content of Ang II in blood plasm and cardiac had increased. NF- κ Bp65 and Ang II could influence and promote each other during myocardial ischemia reperfusion injury.

Key words: reperfusion injury; NF-kappa B; angiotensin II; pyrrolidine dithiocarbamate; imidapril

随着 20 世纪 80 年代心脏介入治疗学的推广,心肌缺血再灌注损伤(IRI)成为一大研究热点。其中 NF- κ B 及 Ang II 均参与了心肌 IRI 的发生发展,在此病理过程中两者的关系也备受关注。已有研究表明, NF- κ B 是 Ang II 的前体血管紧张素原再合成的重要调节因子^[1], NF- κ B 激活可增加组织 Ang I 及 Ang II 水平,并在转录水平影响 AT1R mRNA 表达^[2];同时 Ang II 也能激活 NF- κ B,且有研究认为 Ang II 诱导促炎细胞因子表达是通过 NF- κ B/I κ B 信号转导通路实现的。在此,我们将进一步探讨心肌 IRI 中 NF- κ B 与 Ang II 的关系。

在前期实验的基础上,我们观察到缺血 30 min 再灌注 60 min(I_{30 min}R_{60 min})为 NF- κ Bp65 蛋白表达的高峰点,利用抗氧化剂四氧吡咯二硫氨基(PDTC)及咪达普利分别作为 NF- κ B 和血管紧张素转化酶(ACE)的特异性抑制剂,探讨 NF- κ Bp65 与 Ang II 在心肌 IRI 中的关系及其机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组 雄性健康清洁型 SD 大鼠 32 只,体质量 250~300 g,由福建医科大学动物中心提供。许可证号 SCXK(闽)2004-0002,参照文献报道的方法稍加改进建立动物模型^[3]。按照随机数字表法分为 4 组:(1)IR 组:缺血 30 min

再灌注 60 min;(2)PDTC+IR 组:PDTC 125 mg/kg,用 0.85% 的生理盐水稀释,于缺血前 15 min 腹腔注射;(3)咪达普利+IR 组:咪达普利 3 mg/kg,用 0.85% 的生理盐水稀释,于缺血前 15 min 颈外静脉缓慢推注;(4)PDTC+咪达普利+IR 组:PDTC 125 mg/kg 及咪达普利 3 mg/kg 分别于缺血前 15 min 腹腔注射及颈外静脉缓慢推注。

1.2 标本的采集与处理 实验结束相应时间点取材。(1)取血:含蛋白酶抑制剂的真空试管备用,迅速下腔静脉取血 2 mL 加入试管,用于血浆 Ang II 水平的检测;(2)取组织:迅速剪取平行房室沟下 2 mm 处的左室游离壁心肌,分成 2 块,一块在液氮中速冻后保存到-80℃冰箱用于核蛋白提取;另一块新鲜组织尽快匀浆用于组织 Ang II 水平的检测。

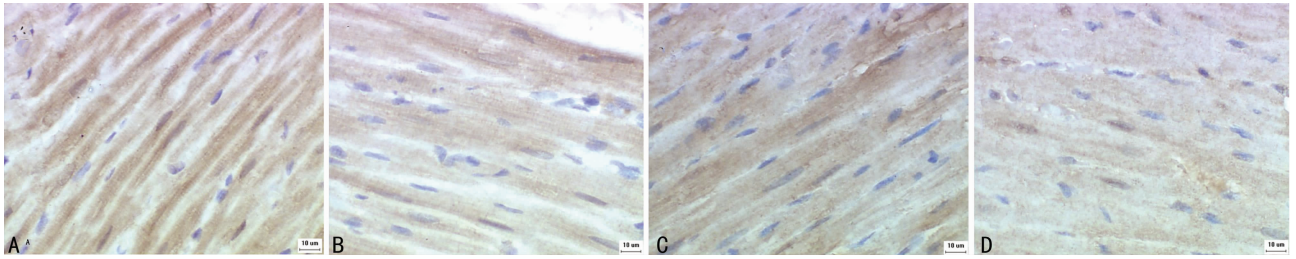
1.3 免疫组织化学分析法 定位和定量检测 NF- κ Bp65 活性;光学显微镜下观察心肌细胞,如出现棕黄色颗粒为阳性表达,活化的 NF- κ Bp65 定位于细胞核;在高倍显微镜下($\times 200$),每组切片选取 10 个视野,细胞总数不少于 500 个,计算阳性细胞数的百分数,用阳性表达率表示 NF- κ Bp65 活化蛋白的核易位表达量。

1.4 ELISA 法检测心肌组织 NF- κ Bp65 蛋白转录活性 提取

心肌组织细胞核蛋白,按照考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒说明书,定量细胞核蛋白数量,按 TransAM NF- κ Bp65 蛋白活性检测试剂盒说明书进行 ELISA。

1.5 放射免疫分析法测定血浆和心肌组织 Ang II 含量 按试剂盒说明书,采用均相竞争放射免疫分析法直接测定血浆和心肌中的 Ang II 含量。

1.6 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用两因素两水平的析因分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



A:IR 组;B:PDTC+IR 组;C:咪达普利+IR 组;D:PDTC+咪达普利+IR 组。

图 1 免疫组织化学分析法测定各组 NF- κ Bp65 蛋白核易位变化($\times 400$)

表 1 药物预处理对 NF- κ Bp65 蛋白核易位的影响($\bar{x} \pm s, n=8, \%$)

组别	核阳性表达率
IR 组	53.82 \pm 6.22
PDTC+IR 组	30.37 \pm 3.44*
咪达普利+IR 组	43.20 \pm 4.58*
PDTC+咪达普利+IR 组	12.26 \pm 1.03*

*: $P < 0.05$, 与 IR 组比较。

2.2 各组血浆及心肌组织 Ang II 水平的变化 由表 2 可见,各药物处理组与 IR 组相比,血浆及组织 Ang II 水平显著下降,两药联合效果更明显,各组之间差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

表 2 药物预处理对血浆及组织 Ang II 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	血浆 Ang II (pg/mL)	组织 Ang II (pg/100 mg)
IR 组	471.00 \pm 48.61	94.24 \pm 13.08
PDTC+IR 组	378.33 \pm 31.83*	63.17 \pm 6.11*
咪达普利+IR 组	306.00 \pm 42.14*	55.73 \pm 7.31*
PDTC+咪达普利+IR 组	284.83 \pm 26.72*	44.90 \pm 7.04*

*: $P < 0.05$, 与 IR 组比较。

3 讨论

PDTC 是 NF- κ B 的特异性抑制剂,主要作用是:(1)具有抗氧化性,体外研究证实它可直接清除反应性氧中介物或与其相关酶的金属离子发生螯合作用,抑制酶活性^[4],从而抑制 NF- κ B 激活;(2)通过阻止 I κ B 与 NF- κ B 分离、阻碍 NF- κ B 核易位等途径阻断 NF- κ B 激活的信号转导通路^[5];(3)具有促氧化作用,通过螯合 Cu²⁺ 产生的复合物能氧化 NF- κ B 的巯基而抑制其活性^[6]。

血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)中的咪达普利是新一

2 结果

2.1 各组 NF- κ Bp65 蛋白核易位变化及 NF- κ Bp65 蛋白转录活性比较 由图 1、表 1 可见:PDTC+IR 组、咪达普利+IR 组及 PDTC+咪达普利+IR 与 IR 组相比,均显著抑制 NF- κ Bp65 蛋白核易位变化,两药联合效果更明显,各组之间差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);进一步检测 NF- κ Bp65 DNA 转录活性,同样,各药物预处理组与 IR 组相比也可显著抑制 NF- κ Bp65 蛋白的 DNA 转录活性,两药联合效果更明显,各组之间差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

代、长效 ACEI 类药物,其活性代谢产物咪达普利拉与体内 ACE 结合,降低 ACE 活性,高选择性作用于肾素血管紧张素醛固酮系统(RAS),从而强效而持久的抑制 Ang II 的生成^[7]。

从实验中笔者不难发现,与 IR 组比较咪达普利预处理在显著降低血浆及组织 Ang II 含量的同时也伴随着 NF- κ Bp65 蛋白活性的下降,提示咪达普利可能通过抑制 Ang II 的表达在一定程度上抑制 NF- κ Bp65 活性。已有多项研究表明 ACEI 和/或 Ang II 受体阻滞剂可通过抑制 NF- κ B 激活对心肌 IRI 的病理过程有所改善^[8-9]。Ang II 可以作为一个内源性促炎症因子激活 NF- κ B 从而增加氧化应激等作用^[10]。Dostal 等^[11]指出 Ang II 可作为一个生长调节因子,促进多种细胞生长因子的合成和释放包括 NF- κ B。Muller 等^[12]报道转肾素、血管紧张素原双基因大鼠心肌细胞、血管内皮细胞和平滑肌细胞 NF- κ Bp65 蛋白表达增加,提示 Ang II 介导的心血管损害与 NF- κ Bp65 活性有关。Marta 等^[13]发现 Ang II 可提高培养的大鼠血管平滑肌细胞中 NF- κ B 的结合活性,Ang II 受体阻滞剂可阻断这一作用并呈剂量依赖性。因此笔者推测在心肌 IRI 中,激活的 Ang II 甚至 RAS 可激活 NF- κ B 转录系统,两者共同参与此病理过程。

其次笔者发现,与 IR 组比较 PDTC 预处理在显著抑制 NF- κ Bp65 蛋白 DNA 转录活性的同时也伴随血浆及组织 Ang II 含量的降低,提示 PDTC 可通过抑制 NF- κ Bp65 的激活在一定程度上抑制 Ang II。Muller 等^[12]曾指出,PDTC 可通过抑制 NF- κ B 激活保护 Ang II 诱导的炎症反应及器官损伤。Brasier 等^[14]发现,NF- κ B 是 Ang II 前体-血管紧张素原再合成的重要调节因子,因此 Ang II 的致炎作用在一定程度上依赖 NF- κ B 的调节。对 AT1 受体基因序列分析也发现其启动序列含有 NF- κ B 的结合序列,提示 NF- κ B 可能会诱导 AT1 受体表达^[15]。因此,笔者推测在心肌 IRI 中,NF- κ Bp65 转录系统的激活对 Ang II 甚或 RAS 的激活有影响,两者共同参与此病理过程。

最后,从药物预处理的角度上,笔者发现咪达普利、PDTC 或两药联合预处理均抑制 Ang II 与 NF- κ Bp65 活性,ACEI 类药物对心脏的保护已毋庸置疑,PDTC 的使用仍处于实验室阶段,

以此为新的靶点,可能为临床防治心肌 IRI 提供更多的途径。

综上所述,心肌 IRI 是多种生物活性因子参与的复杂病理过程,涉及多种复杂细胞信号转导机制,其中 Ang II 或 RAS 与 NF- κ Bp65 可相互激活,并在多层次和诸多环节存在交互作用。

参考文献:

- [1] Brasier AR, Jamaluddin M, Han Y, et al. Angiotensin II induces gene transcription through cell-type-dependent effects on the nuclear factor-kappaB (NF- κ B) transcription factor[J]. Mol Cell Biochem, 2000, 212: 155-169.
- [2] Cowling RT, Zhang X, Reese VC, et al. Effect of cytokine treatment on type 1A angiotensin II receptor (AT1A) transcription and splicing in rat cardiac fibroblasts[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289(3): H1176-1183.
- [3] 刘付平,姚宏伟,李俊.大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的改进[J].安徽医科大学学报,2003,38(3):234-236.
- [4] Boyle EM Jr, Kovacich JC, Canty TG Jr, et al. Inhibition of nuclear factor-kappa B nuclear localization reduces human E-selectin expression and the systemic inflammatory response[J]. Circulation, 1998, 98(19): 282-288.
- [5] Lakshminarayanan V, Lewallen M, Frangogiannis NG, et al. Reactive oxygen intermediates induce monocyte chemotactic protein-1 in vascular endothelium after brief ischemia[J]. Am J Pathol, 2001, 159(4): 1301-1311.
- [6] Kis A, Yellon DM, Baxter GF. Second window of protection following myocardial preconditioning; an essential role for PI3 kinase and p70S6 kinase[J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(9): 1063-1071.
- [7] 王吉云,胡大一.较高选择性 ACE 抑制剂—咪达普利[J].中国医药导刊,2000,2(3):39-41.
- [8] Das UN. Angiotensin- II behaves as an endogenous pro-inflammatory molecule [J]. J Assoc Physicians India, 2005, 53: 472-476.
- [9] Bond M, Chase AJ, Baker AH, et al. Inhibition of transcription factor NF-kappaB reduces matrix metalloproteinase-1, -3, and -9 production by vascular smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Res, 2001, 50(3): 556-565.
- [10] Das UN. Angiotensin- II behaves as an endogenous pro-inflammatory molecule [J]. J Assoc Physicians India, 2005, 53: 472-476.
- [11] Dostal DE, Hunt RA, Kule CE, et al. Molecular mechanisms of angiotensin II in modulating cardiac function; intracardiac effects and signal transduction pathways[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29(11): 2893-2902.
- [12] Muller DN, Dechend R, Mervaala EM, et al. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats [J]. Hypertension, 2000, 35(2): 193-201.
- [13] Marta Ruiz-Ortega, Oscar Lorenzo, Monica Ruperez, et al. Angiotensin II activates nuclear transcription factor- κ B through AT1 and AT2 in vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 2000, 86: 1266-1272.
- [14] Brasier AR, Recinos A 3rd, Eledrisi MS. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(8): 1257-1266.
- [15] Cowling RT, Gurantz D, Peng J, et al. Transcription factor NF-kappa B is necessary for up-regulation of type 1 angiotensin II receptor mRNA in rat cardiac fibroblasts treated with tumor necrosis factor-alpha or interleukin-1 beta [J]. J Biol Chem, 2002, 277(8): 5719-5724.

(收稿日期:2013-10-16 修回日期:2013-12-26)

《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。
2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。
3. 资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 M(QR) 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要清楚区分百分率和百分比。
4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对于具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。
5. 统计结果的解释和表达:应写明采用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体指(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P>0.05, P<0.05$ 和 $P<0.01$ 3 种表达方式,无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时,再给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间(CI)。