

· 实验研究 ·

双参通冠方对急性心肌缺血再灌注模型核因子- κ B 信号途径及细胞间隙连接通讯的影响

刘建勋 韩 笑 马晓斌 王杨慧

摘要 目的 观察双参通冠方(SSTG)对急性心肌缺血再灌注损伤动物模型心肌梗死面积及重量、心肌核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)信号途径及心肌细胞间隙连接蛋白 Cx43 的影响。方法 用冠状动脉结扎/放松法复制大鼠心肌缺血再灌注损伤模型, N-BT 染色法测量心肌梗死范围;免疫组织化学法检测心肌组织 NF- κ B p65 表达;双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定各组血清肿瘤坏死因子(TNF- α)和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)含量;免疫组织化学法测定心肌细胞通讯间隙连接蛋白 Cx43 表达。结果 模型组大鼠心肌梗死面积及梗死区重量、NF- κ B p65 表达、血清中 TNF- α 及 ICAM-1 含量明显升高($P < 0.05$);心肌连接蛋白 Cx43 大量降解。SSTG 处理后心肌梗死面积及重量减轻;血清中 TNF- α 、ICAM-1 水平下调($P < 0.05$);NF- κ B p65 表达及 Cx43 降解抑制。结论 缺血再灌注时,心肌梗死严重, NF- κ B 信号途径可被激活, Cx43 降解严重。SSTG 能抑制 NF- κ B 的活化,抑制血清中 TNF- α 、ICAM-1 的过量分泌和抑制 Cx43 的降解,减小心肌梗死面积及重量。

关键词 双参通冠方;缺血再灌注损伤;核因子- κ B;信号途径;肿瘤坏死因子;细胞间黏附分子-1;细胞间通讯;连接蛋白 43

Effect of Shuangshen Tongguan Recipe on Nuclear Factor-kappa B Signal Pathway and Myocardial Junction-Mediated Intercellular Communication in Acute Myocardial Ischemia/Reperfusion Injured Model Rats LIU Jian-xun, HAN Xiao, MA Xiao-bin, et al *Experiment Research Center, Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100091)*

Objective To investigate the effects of Shuangshen Tongguan Recipe (SSTG) on myocardial nuclear factor-kappa B (NF- κ B) signal pathway, expression of myocardial junction intercellular communication (MJIC) connexin 43 (Cx43), and infarcted myocardial size and weight of the rats' heart after acute myocardial ischemia/reperfusion (I/R) damage. **Methods** Model rat of I/R injury was established by coronary arterial ligating/releasing. The infarcted myocardial size and weight were determined by N-BT staining, expression of NF- κ B p65 in myocardial tissue and Cx43 were determined by immunohistochemical method, contents of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were measured by ABC-ELISA. **Results** The myocardial infarcted size and weight, expression of NF- κ B p65, contents of serum TNF- α and ICAM-1 of I/R injured rats in the model group were significantly increased ($P < 0.05$), while Cx43 degraded markedly after modeling. These changes were restored after treated with SSTG ($P < 0.05$). **Conclusion** Serious myocardial infarction occurs after ischemia/reperfusion injury, combined with NF- κ B signal pathway activation and severe Cx43 degradation. SSTG could inhibit the activation of NF- κ B, the over-excretion of TNF- α and ICAM-1 in serum, and the degradation of Cx43 to decrease the myocardial infarcted size and weight.

Key words Shuangshen Tongguan Recipe; ischemia/reperfusion injury; nuclear factor- κ B; signal pathway; tumor necrosis factor- α ; intercellular adhesion molecule-1; intercellular communication; connexin 43

基金项目 国家“863”计划课题(No. 2004AA223812)

作者单位 中国中医研究院西苑医院实验研究中心(北京 100091)

通讯作者 刘建勋; Tel: 010-62886691; E-mail: jianxun@ht.rol.

cn. net

万方数据

心肌缺血再灌注损伤是阻碍缺血心肌从再灌注疗法中获得最佳疗效的主要原因。多种细胞的信号途径参与了缺血再灌注的病理生理过程,其中核因子- κ B [nuclear factor-kappa B, NF- κ B]信号系统在心肌缺血

再灌注损伤中发挥了关键性作用。间隙连接(gap junction, GJ)是细胞间通讯的主要方式。心室的间隙连接通道主要由连接蛋白 Cx43 构成, Cx43 的正常表达与分布是间隙连接通道电耦联功能正常和心脏正常电活动和协调舒缩的重要保证^[1]。目前大量研究集中在慢性心肌缺血及心肌梗死方面, 而对急性心肌缺血再灌注损伤时 Cx43 改变方面的研究较少。

本实验采用在体心肌缺血再灌注损伤模型, 观察双参通冠方(SSTG)对心肌缺血再灌注时心肌细胞内 NF-κB 活性及其下游信号分子即血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)含量的影响及心肌 Cx43 的表达及分布, 探讨 SSTG 心肌保护作用机理。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 健康 SD 大鼠, 雄性, 体重 250~280g, 中国科学院遗传与发育生物研究所动物中心提供。

1.2 药物与试剂 SSTG 为提取人参、丹参等有效部位, 按固定比例配伍而成。以多种有效成分(如人参皂苷 Rg1、丹酚酸 B)控制其质量, 45mg 双参通冠方提取物相当于 4.18g 生药材, 由本实验室提供。兔抗 NF-κBp65 多抗为 Santa Cruz 产品; 兔 Cx43 多抗为 Zymed 公司产品; Power Vision6001 检测系统为 Power Vision 公司产品; PBS 粉、DAB 显色剂均由北京中山生物技术有限公司提供; TNF-α、ICAM-1 酶联免疫检测试剂盒为美国进口分装, 北京天象-邦定医学联合体公司提供。

1.3 仪器 电动呼吸机, MODEL SC-3 为上海医疗设备厂产品; CM-1850 冰冻切片机为德国 LEICA 公司产品; 550 型酶标仪为日本 RIO-RAD 公司产品; HPIAS1000 型病理图像分析仪为北京空海公司产品。

2 方法

2.1 动物分组与给药 取 64 只大鼠随机分为 4 组, 即正常组、模型组、SSTG 高、低剂量组, 每组 16 只(其中 8 只用于 N-BT 染色, 8 只用于 NF-κB、Cx43 免疫组化及血清中 TNF-α、ICAM-1 含量测定)。十二指肠给药, 正常组及模型组给生理盐水, SSTG 高、低剂量分别给 45、22.5mg/kg(生理盐水配制 SSTG, 给药体积 3 ml/kg)。

2.2 造模 10% 乌拉坦麻醉, 开胸, 气管插管连接电动呼吸机(吸呼比为 1:2, 呼吸频率为 30 次/min, 气道压力为 3kPa), 左冠状动脉前降支根部穿结扎线,

平衡 10min 后, 除正常组外结扎冠状动脉造成缺血, 结扎后即立刻十二指肠给药。40min 后放开结扎线形成再灌模型, 持续 2h。

2.3 缺血再灌注心肌硝基四氮唑蓝(N-BT)染色 再灌注 2h 后摘取心脏, 生理盐水洗净心脏, 均匀切成 5 片, 称重, N-BT 染色, 图像分析仪计算心肌梗死面积, 计算心肌梗死区所占的面积及重量, 梗死区占心室(心脏)面积的百分率。

2.4 血清 TNF-α、ICAM-1 含量测定 再灌注 2h 后腹主动脉取血, 自然分离血清, 双抗体夹心 ELISA 法检测血清中 TNF-α、ICAM-1 含量。具体步骤按试剂盒说明书操作, 酶标仪 492nm 处测 OD 值, 绘制标准曲线, 计算样品中 TNF-α、ICAM-1 浓度。

2.5 切片病理学观察及免疫组化染色 再灌注 2h 后摘取心脏, 冰生理盐水冲净血液, 结扎线下 3mm 处取 2mm 厚心肌, 液氮冷冻, -20℃ 冰冻切片, 片厚 8μm, 冰冻切片, HE 染色, 观察心肌组织病理改变。NF-κB、Cx43 免疫组化切片入丙酮固定 4min, 3% H₂O₂ 孵育 5min, 滴加兔抗 NF-κB p65 抗体(1:100), 兔抗 Cx43 抗体(1:100), 室温 60min, PBS 冲洗(2×3min), 滴加山羊抗兔 IgG 抗体多聚体 20min, PBS 冲洗(2×3min), DAB 显色, 蒸馏水冲洗, 复染, 脱水, 二甲苯透明, 封片, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照。连续选取切片缺血区及缺血区与正常区交界带 5 个视野(400 倍)作为观察区, 多媒体病理图像分析系统计算 5 个视野内阳性细胞百分率, 免疫反应物斑点总面积、平均吸光度、面密度(阳性目标总面积/统计场总面积)及阳性单位。

3 统计学方法 采用 SPSS 10.0 软件作单因素方差统计分析(One-Way ANOVA)。

结 果

1 各组大鼠心肌 N-BT 染色结果 见表 1。正常组大鼠心肌染成暗蓝色, 梗死区心肌不着色, 模型组大鼠梗死严重, SSTG 高、低剂量组大鼠梗死面积明显缩小, 梗死区/心室(心脏)百分率降低, 梗死区重量减轻, 与模型组比较差异有显著性(P<0.05), SSTG 高、低剂量组比较差异无显著性。

表 1 各组大鼠心肌 N-BT 染色结果比较 (x̄ ± s)

组别	n	梗死面积 (mm ²)	梗死区/心室 (%)	梗死区/心脏 (%)	梗死区重量 (g)
正常	8	—	—	—	—
模型	8	88.36 ± 18.27	28.66 ± 4.85	23.58 ± 4.43	0.208 ± 0.046
SSTG 高剂量	8	62.95 ± 19.93 **	23.34 ± 4.42 *	19.06 ± 3.36 *	0.157 ± 0.033 *
低剂量	8	70.02 ± 16.96 *	22.35 ± 4.24 *	18.50 ± 2.84 *	0.162 ± 0.045 *

注: 与模型组比较, * P<0.05, ** P<0.01

2 各组大鼠血清 TNF-α、ICAM-1 水平测定结果见表 2。与模型组比较, SSTG 高、低剂量组 TNF-α、ICAM-1 含量均下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。SSTG 高、低剂量组比较差异无显著性。

表 2 各组大鼠血清中 TNF-α、ICAM-1 水平测定结果比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α	ICAM-1
正常	8	62.79 ± 1.89	46.89 ± 0.42
模型	8	70.02 ± 3.09 *	50.26 ± 1.04 *
SSTG 高剂量	8	67.15 ± 1.76 [△]	48.39 ± 1.07 ^{△△}
低剂量	8	66.04 ± 2.20 ^{△△}	47.76 ± 0.09 ^{△△}

注:与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

3 各组大鼠切片病理学观察结果 HE 染色光镜观察见:正常组大鼠心肌细胞排列整齐,着色均匀,胞膜完整,无变性、坏死等改变;造模后各组大鼠梗死区心肌细胞排列紊乱,着色不均匀,部分区域心肌细胞浊肿,心肌纤维横纹不清或消失,核裂解消失;SSTG 高、低剂量组梗死区亦有心肌细胞变性与坏死改变,但程度较轻,着色相对均匀,水肿变性减轻,心肌坏死范围较小。

4 各组大鼠心肌 NF-κB 免疫组化检测结果 正常组大鼠心肌组织中 NF-κB 呈低表达状态,且阳性表达出现在胞浆中;模型组梗死区 NF-κB 活化,表达增强,阳性颗粒出现在胞浆及胞核中;SSTG 高、低剂量组梗死区 NF-κB 表达的活性较模型组低,胞核阳性表达减少(图略)。图像分析仪结果显示模型组大鼠 NF-κB 阳性表达百分率、免疫反应斑点总面积、平均吸光度、面密度及阳性单位均显著升高(与正常组比较, $P < 0.01$)。SSTG 高、低剂量组上述指标均下调,与模型组比较差异均有显著性($P < 0.01$),见表 3。

5 各组大鼠心肌 Cx43 免疫组化检测结果 光

镜下见:正常组大鼠心肌细胞中 Cx43 蛋白表达信号呈强阳性,几乎均匀连续密集分布在心肌细胞端-端相接部位,少数位于与心肌纤维长轴平行的侧-侧相接处;阴性对照片未见到 Cx43 特异性染色。缺血再灌注组 Cx43 的消失从梗死中心区到边缘区再到非缺血区呈逐渐移行性变化,越靠近梗死中心区 Cx43 消失越明显,尤其是细胞端-端相接处 Cx43 几乎全部消失,残存的 Cx43 特异性染色因缺血变性,抗原性减弱,染色减轻(图略)。图像分析仪结果显示模型组大鼠梗死区 Cx43 阳性表达百分率、免疫反应斑点总面积、平均灰度及面密度(阳性目标总面积/统计场总面积)均降低(与正常组比较, $P < 0.01$)。SSTG 高、低剂量组大鼠上述指标均上升,与模型组比较差异均有显著性($P < 0.01$),见表 4。

讨 论

NF-κB 是一种广泛存在的转录因子,在静息情况下,以同源二聚体形式存在于胞浆中,并与抑制性蛋白 I-κB 结合呈无活性状态。外源性刺激如缺血再灌注等通过一系列信号转导引起 I-κB 降解, NF-κB- I-κB 复合物解体, NF-κB 从复合物中释放出来得以活化(活化形式以 p50、p65 异源二聚体为多见),借助被暴露出来的核定位信号(NLS)进入细胞核,在核内与靶基因的特异序列结合并启动转录^[1],调控健康状态及病理情况下许多基因,如细胞因子、趋化因子、生长因子和细胞黏附分子等的表达。

有研究表明, NF-κB 在心脏缺血再灌注损伤过程中发挥了关键性作用。在离体工作心脏模型上观察到^[2],心脏单纯性短时间缺血即可引起 NF-κB 活性迅速地显著性升高,短时缺血及缺血再灌注可进一步升

表 3 各组大鼠心肌 NF-κB 免疫组化结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	阳性表达百分率 (%)	免疫反应斑点总面积(μm^2)	平均吸光度	面密度	阳性单位
正常	8	1.62 ± 0.72	0.92 ± 1.24	0.08 ± 0.06	0.04 ± 0.05	16.12 ± 9.84
模型	8	16.44 ± 7.52 *	7.08 ± 3.48 *	0.18 ± 0.04 *	0.11 ± 0.02 *	32.94 ± 2.01 *
SSTG 高剂量	8	4.70 ± 3.69 ^{△▲}	3.65 ± 2.42 [△]	0.15 ± 0.03 ^{△▲}	0.05 ± 0.03 ^{△▲}	28.34 ± 4.10 ^{△▲}
低剂量	8	8.83 ± 5.35 [△]	3.47 ± 1.72 [△]	0.13 ± 0.03 [△]	0.08 ± 0.01 [△]	25.89 ± 5.10 [△]

注:与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.01$; 与 SSTG 低剂量组比较, [▲] $P < 0.01$

表 4 各组大鼠心肌 Cx43 免疫组化结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	阳性表达百分率 (%)	免疫反应斑点总面积(μm^2)	平均灰度	面密度
正常	8	20.87 ± 4.04	10.56 ± 3.36	148.44 ± 12.74	0.076 ± 0.021
模型	8	1.30 ± 0.76 *	1.06 ± 0.59 *	130.54 ± 17.18 *	0.049 ± 0.034 *
SSTG 高剂量	8	7.48 ± 2.51 ^{△▲}	6.38 ± 1.90 ^{△▲}	151.25 ± 3.55 ^{△▲}	0.073 ± 0.003 [△]
低剂量	8	5.18 ± 3.15 [△]	4.15 ± 2.05 [△]	142.45 ± 18.02 [△]	0.069 ± 0.005 [△]

注:与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, [△] $P < 0.01$; 与 SSTG 低剂量组比较, [▲] $P < 0.01$

高 NF- κ B 活性,说明 NF- κ B 是心脏应激反应快速表达基因。功能性 NF- κ B 结合序列广泛存在于细胞因子、黏附分子,如 TNF- α 、ICAM-1 等启动子和增强子^[3]。NF- κ B 的活化导致上述基因的表达,转录产生的 TNF- α 、ICAM-1 可直接引起血管内皮细胞和心肌细胞的损伤。新近理论认为,TNF- α 除对局部的组织、细胞有直接作用外,还诱导血管内皮或心肌细胞上多种黏附分子 ICAM-1 的表达^[4],介导白细胞与血管内皮细胞黏附,并向血管外迁移,黏附心肌细胞,释放细胞毒,损伤心肌。减少 TNF- α 、ICAM-1 的分泌有利于保护心肌细胞。总之,NF- κ B 间接介导白细胞与血管内皮细胞的结合,是心脏缺血再灌注损伤的关键一步。

Cx43 是组成心室肌 GJ 的主要成分,对维持细胞间兴奋性传递有重要意义。心肌 Cx43 下降,可导致心肌兴奋性、传导性改变。慢性心肌缺血和陈旧性心肌梗死时 Cx43 大量降解、分布紊乱,与心律失常的发生有密切关系^[5]。对犬慢性心肌缺血模型闰盘超微结构分析发现,与正常组心肌相比,每单位长度闰盘的间隙连接数量和面积均明显减少,从细胞超微结构水平上研究了心肌缺血时细胞电耦联障碍的解剖学基础^[6]。研究还发现,在边缘带-非缺血区邻接处 Cx43 阳性 GJ 分布的严重紊乱,排列不均使此区域心肌的激动波阵面(wave front)弯曲,形成折返激动。梗死灶中心 Cx43 完全消失,形成激动扩布的一个解剖性障碍,成为折返性螺旋波赖以“附着”的形态学基础^[7],而心肌细胞耦联恢复不均匀,心电活动与传导不均一形成的恶性心律失常是缺血再灌注死亡的一个重要原因。

本实验数据表明,模型组心肌组织 NF- κ B p65 阳性表达增加,不仅出现在胞浆,还出现在胞核,表明 NF- κ B 活性增加,并向细胞核内转位,下游信号分子 TNF- α 、ICAM-1 在血清中的含量也明显增加,这一结果与文献报道结果一致,提示心肌缺血再灌注诱导 NF- κ B 的活化,NF- κ B 由胞浆向细胞核转位,进入细胞核后与靶基因 κ B 位点结合,诱导其下游信号分子 TNF- α 、ICAM-1 的过量分泌。SSTG 能抑制 NF- κ B 的活化,在一定程度上阻断了 NF- κ B 相关信号通路的传导,下调 TNF- α 、ICAM-1 水平,保护心肌,表现为缩小心肌梗死面积及减轻梗死区重量。提示药物对 TNF- α 、ICAM-1 及 NF- κ B 表达的均衡性有一定的调节作用,且药物用量并非越大越好,其深入机制还有待阐明。

实验数据还表明,急性心肌缺血再灌注心肌梗死时,Cx43 大量降解,Cx43 阳性 GJ 破坏从梗死中心区到边缘带到非缺血区呈移行性变化,这也会使心肌激动通过这些区域时出现传导速度不均一性增高,形成折返性心律失常的结构学基础,双参通冠方可能通过抑制 Cx43 的降解,改善心肌细胞间通讯,降低心肌激动传导速度不均性,消除或减少折返形成,保护心肌,表现为缩小心肌梗死面积及减轻梗死区重量。实验中还发现,心肌细胞端对端连接处 Cx43 消失较对侧连接处严重,可能与心肌细胞纵轴排列的 GJ 因有毛细血管伴行,缺血相对较轻有关。总之,NF- κ B、TNF- α 、ICAM-1 信号途径及 Cx43 蛋白在心肌缺血再灌注中发挥了重要作用,适度干预 NF- κ B 的活化及 Cx43 的降解有利于保护缺血心肌。由于多种因素可以引起 NF- κ B 活化及 Cx43 降解,对心肌缺血再灌注损伤 NF- κ B 活化的上游或下游信号系统、Cx43 与心律失常等相关性研究及 SSTG 的干预作用还有待进一步的探讨。

参 考 文 献

- 1 Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, et al. Nuclear localization of I- κ B promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm. *J Cell Sci* 1997;110(Pt 3): 369—378.
- 2 Li C, BrBwder W, Kao RL. Early activation of transcription factor NF- κ B during ischemia in perfused rat heart. *Am J Physiol* 1992;276:H543—552.
- 3 Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Ann Rev Immunol* 1994;12:141—179.
- 4 陈修,陈维洲,曾贵云.心血管药理学.北京:人民卫生出版社,1998:117.
Chen X, Chen WZ, Zeng GY. Angiomyocardiac pharmacology. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998:117.
- 5 Peters NS. New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap-junctional coupling in normal, ischemic and hypertrophied hearts. *Clin Sci (Lond)* 1996;90(6): 447—452.
- 6 Luke RA, Saffitz JE. Remodeling of ventricular conduction pathway in healed canine infarct border zones. *J Clin Invest* 1991;87(5):1594—1602.
- 7 Ikeda T, Yashima M, Uchida T, et al. Attachment of meandering reentrant wave fronts to anatomic obstacles in the atrium, role of the obstacle size. *Circ Res* 1997;81(5):753—764.

(收稿 2004-01-12 修回 2004-10-25)