

### 【基础研究】

中图分类号: R541.6 文献标志码: A 文章编号: 1004-7239(2017)02-0094-05

# Effects of simvastatin on myocardial silent mating type information regulation 2 homolog-2/nuclear factor-κB signaling pathway in rabbits with chronic heart failure

ZHAO Yun<sup>1</sup>, WANG Yu-hua<sup>2</sup>, ZHAO Guo-an<sup>3</sup>, ZHAO Yi-lin<sup>4</sup>

(1. Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Urinary Surgery, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 3. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China; 4. Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of simvastatin on silent mating type information regulation 2 homolog-2 (SIRT2)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway in rabbits with chronic heart failure. **Methods** Twenty-four New Zealand male rabbits were randomly divided into normal group, chronic heart failure (CHF) group and simvastatin group, with eight rabbits in each group. The rabbits in the CHF group and simvastatin group were daily injected with  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  adriamycin through ear vein to establish CHF models. The rabbits in the normal group were injected with the same dose of saline injection. At the same time, the rabbits in simvastatin group were treated with  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  simvastatin by intragastric administration

**DOI:**10.7683/xxxyxb.2017.02.004

收稿日期:2016-11-03

作者简介:赵云(1988-),女,河南驻马店人,硕士研究生在读,研究方向:慢性心力衰竭的治疗。

通信作者:赵国安(1965-),男,满族,山东成武人,博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:慢性心力衰竭的治疗;E-mail:guoanzhao@yeah.net。

daily, and the rabbits in normal group and CHF group were treated with the same dose of physiological saline by intragastric administration daily. All the rabbits were dealt for twelve weeks. The heart function of the rabbits in the groups was observed by ultrasonography at the end of modeling. The rabbits were sacrificed and the left ventricles were made into paraffin embedded sections. The histological changes of myocardium were observed by hematoxylin eosin staining. The expression of SIRT2 and NF-κB protein in myocardial tissue of rabbits in the groups was detected by immunohistochemical method. The expression of SIRT2 mRNA and NF-κB mRNA was detected by reverse transcription polymerase chain reaction. **Results** Compared with the normal group, the left ventricular ejection fraction (LVEF) of rabbits was significantly decreased ( $P < 0.01$ ), and the left ventricular end diastolic dimension (LVDD) of rabbits was significantly increased in the simvastatin group and CHF group ( $P < 0.01$ ). Compared with the CHF group, the LVEF of rabbits was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the LVDD of rabbits was significantly decreased in the simvastatin group ( $P < 0.01$ ). The positive expression rate of SIRT2 protein in myocardial cells of rabbits in CHF group was significantly lower than that in normal group ( $P < 0.01$ ). The positive expression rate of SIRT2 protein in myocardial cells of rabbits in simvastatin group was significantly higher than that in normal group and CHF group ( $P < 0.01$ ). The positive expression rate of NF-κB protein in myocardial cells of rabbits in CHF group was significantly higher than that in normal group ( $P < 0.01$ ). The positive expression rate of NF-κB protein in myocardial cells of rabbits in simvastatin group was significantly lower than that in normal group and CHF group ( $P < 0.01$ ). The relative expression of SIRT2 mRNA in myocardial cells of rabbits in CHF group was significantly lower than that in normal group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of SIRT2 mRNA in myocardial cells of rabbits in simvastatin group was significantly higher than that in normal group and CHF group ( $P < 0.01$ ). The relative expression of NF-κB mRNA in myocardial cells of rabbits in CHF group was significantly higher than that in normal group ( $P < 0.01$ ). The relative expression of NF-κB mRNA in myocardial cells of rabbits in simvastatin group was significantly lower than that in normal group and CHF group ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Simvastatin may inhibit the expression of NF-κB by up-regulating the expression of SIRT2 in myocardial cells of rabbits, which can improve cardiac function of rabbits.

**Key words:** simvastatin; chronic heart failure; silent mating type information regulation 2 homolog-2; nuclear factor-κB

慢性心力衰竭是各种心脏疾病发展晚期或终末期复杂的临床综合征。在心力衰竭的发病机制中,心肌凋亡起重要作用,而信号通路如 p53 信号通路、核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 信号通路等已成为研究热点,通路中的 Sirtuins 去乙酰化酶家族备受关注。Sirtuins 去乙酰化酶家族是酵母沉默信息调节蛋白 2 (silent mating type information regulation 2, Sir2) 在哺乳动物中的同源物,是一类依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD<sup>+</sup>) 的核心区域高度保守的蛋白去乙酰化酶和二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 核糖基转移酶,包括沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (silent mating type information regulation 2 homolog-1, SIRT1) ~ SIRT7, 在细胞凋亡、多种糖脂代谢、肿瘤等发挥重要作用。相关文献报道, SIRT2 参与 NF-κB 信号通路<sup>[1]</sup>, 而 NF-κB 在凋亡中发挥重要作用。他汀类药物除了调脂作用外, 还有改善内皮功能、抗氧化作用、抗炎症反应、改善心肌重构、调节神经激素活性、恢复神经自主功能等作用。本研究应用阿霉素建立慢性心力衰竭兔模型, 观察辛伐他汀对其心功能及 SIRT2/NF-κB 信号通路的影响, 探讨慢性心力衰竭治疗的分子机制。

## 1 材料与方法

- 1.1 动物 雄性新西兰大白兔 24 只, 体质量 2.0 ~ 2.5 kg, 由新乡医学院实验动物中心提供, 用专用食物和笼子供养, 随机分为正常组、心力衰竭组和辛伐他汀组, 每组 8 只。
- 1.2 主要试剂及仪器 注射用盐酸多柔比星 (山西普德药业有限公司, 国药准字 H14023143), 辛伐他汀片 (山东罗欣药业股份有限公司, 国药准字 H20065119); XSZ-H-9507285 显微镜 (重庆光学仪器厂); 免疫组织化学孵育箱 (浙江余姚仪器厂); 实时荧光定量聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 [罗氏诊断产品 (上海) 有限公司]。
- 1.3 动物模型制备 心力衰竭组和辛伐他汀组兔分别按  $2\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  经耳缘静脉注射  $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  阿霉素生理盐水注射液, 每周 1 次, 连续 6 周; 第 7 周开始按  $1.5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  经耳缘静脉注射  $1\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  阿霉素生理盐水注射液, 每周 1 次, 连续 6 周; 阿霉素累计剂量为  $21\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 建立慢性心力衰竭模型。正常组兔给予相同剂量生理盐水注射液。经耳缘静脉注射的同时, 辛伐他汀组兔每日按  $1.5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  给予辛伐他汀灌胃, 正常组和心力衰竭组兔给予相同剂量生理盐水灌胃, 均连续 12 周。
- 1.4 兔心脏超声检查 在造模结束时做心脏超声,

记录各组兔的左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左心室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVDd)。

**1.5 兔心脏组织病理学检查** 心脏超声检查后处死各组兔,取出心脏,冲洗干净,取左心室心肌组织,甲醛固定,脱水,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,显微镜下观察心肌组织形态变化。

**1.6 免疫组织化学法检测兔心肌细胞中 SIRT2、NF-κB 蛋白表达** 兔心肌组织石蜡切片进行脱蜡、水化等,镜下观察结果,蓝色为细胞核,SIRT2、NF-κB 阳性信号均为棕褐色。每张切片任意取 5 个高倍视野,计数每个视野阳性细胞率,算出平均数,即为每张切片阳性细胞率。

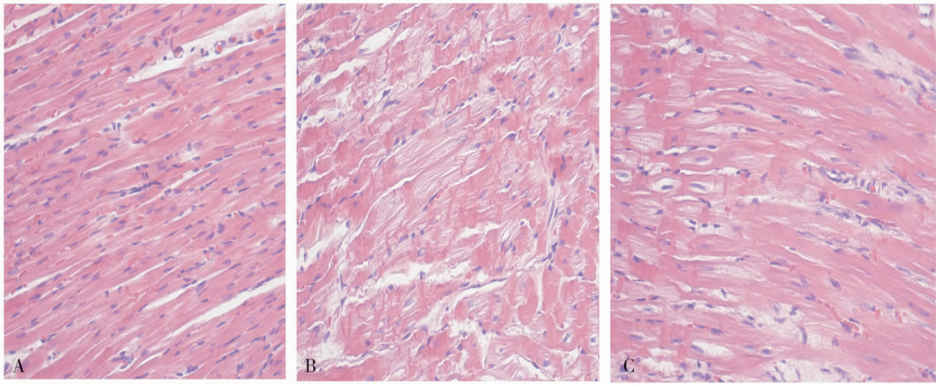
**1.7 反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription-PCR, RT-PCR)检测兔心肌组织中 SIRT2 mRNA、NF-κB mRNA 表达** 用 TRIzol 试剂提取兔心肌组织中的 RNA,以提取的 RNA 为模板反转录合成 cDNA,进行实时荧光定量 PCR,将荧光定量

PCR 测定的结果用相对定量的方法以内参基因为参照算出目的基因的相对表达量。

**1.8 统计学处理** 应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两样本均数的比较经正态性检验和方差齐性分析后,选择 *t* 检验或单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 3 组兔心肌组织形态变化** 造模过程中,正常组兔无死亡,心力衰竭组兔死亡 3 只,辛伐他汀组兔死亡 2 只。3 组存活的兔进行心肌组织形态学观察,结果显示,正常组兔心肌细胞排列整齐,细胞间隙正常,细胞核清晰(图 1A);心力衰竭组兔心肌纤维排列紊乱,部分断裂甚至溶解,细胞核出现异型,部分细胞出现水肿和空泡变性,心肌细胞间隙明显增宽(图 1B);辛伐他汀组兔心肌细胞水肿和空泡变性较心力衰竭组减轻,心肌纤维较心力衰竭组排列整齐(图 1C)。



A: 正常组;B: 心力衰竭组;C: 辛伐他汀组。

图 1 3 组兔心肌组织形态(HE 染色, ×200)

Fig.1 Morphology of myocardial tissue of rabbits in the three groups(HE staining, ×200)

**2.2 3 组兔心脏超声检查结果** 结果见表 1。心力衰竭组和辛伐他汀组兔的 LVEF 均低于正常组, LVDd 均高于正常组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );辛伐他汀组兔的 LVEF 高于心力衰竭组, LVDd 低于心力衰竭组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 1 3 组兔心力衰竭功能指标比较

Tab.1 Comparison of cardiac function indexes of rabbits in the three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

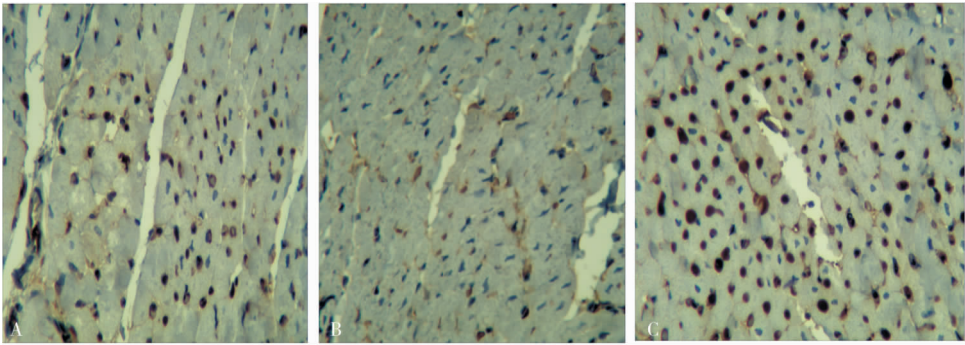
组别	<i>n</i>	LVEF/%	LVDd/mm
正常组	8	62.13 ± 2.36	11.50 ± 0.93
心力衰竭组	5	39.60 ± 1.14 <sup>a</sup>	17.00 ± 1.22 <sup>a</sup>
辛伐他汀组	6	46.83 ± 1.47 <sup>ab</sup>	14.17 ± 0.75 <sup>ab</sup>

注:与正常组比较<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与心力衰竭组比较<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

**2.3 3 组兔心肌细胞中 SIRT2 蛋白表达比较** 结果见图 2。正常组、心力衰竭组、辛伐他汀组兔心肌细胞中 SIRT2 蛋白阳性表达率分别为(41.06 ±

0.59)%、(20.29 ± 0.64)%、(68.63 ± 0.53)%。与正常组比较,心力衰竭组兔心肌细胞中 SIRT2 蛋白阳性表达率降低( $P < 0.01$ ),辛伐他汀组兔心肌细胞中 SIRT2 蛋白阳性表达率升高( $P < 0.01$ ),且辛伐他汀组新西兰大白兔心肌细胞中 SIRT2 蛋白阳性表达率高于心力衰竭组( $P < 0.01$ )。

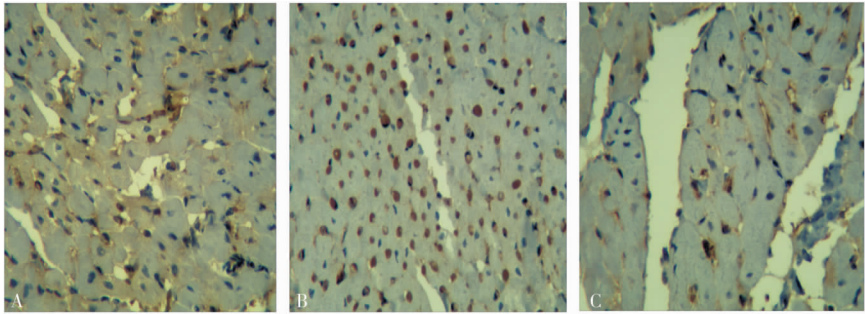
**2.4 3 组兔心肌细胞中 NF-κB 蛋白表达比较** 结果见图 3。正常组、心力衰竭组、辛伐他汀组兔心肌细胞中 NF-κB 蛋白阳性表达率分别为(17.61 ± 0.68)%、(27.74 ± 0.50)%、(10.89 ± 0.63)%。与正常组比较,心力衰竭组兔心肌细胞中 NF-κB 蛋白阳性表达率升高( $P < 0.01$ ),辛伐他汀组兔心肌细胞中 NF-κB 蛋白阳性表达率降低( $P < 0.01$ ),且辛伐他汀组兔心肌细胞中 NF-κB 蛋白阳性表达率低于心力衰竭组( $P < 0.01$ )。



A: 正常组;B: 心力衰竭组;C: 辛伐他汀组。

图2 3组兔心肌细胞中 SIRT2 蛋白表达(免疫组织化学, ×200)

Fig.2 Expression of SIRT2 protein in myocardial cells of rabbits in the three groups



A: 正常组;B: 心力衰竭组;C: 辛伐他汀组。

图3 3组兔心肌细胞中 NF-κB 蛋白表达(免疫组织化学, ×200)

Fig.3 Expression of NF-κB protein in myocardial cells of rabbits in the three groups

**2.5 3组兔心肌组织中 SIRT2 mRNA、NF-κB mRNA 相对表达量比较** 结果见表2。与正常组比较,心力衰竭组兔心肌组织中 SIRT2 mRNA 相对表达量降低 ( $P < 0.05$ ),辛伐他汀组兔心肌组织中 SIRT2 mRNA 相对表达量升高 ( $P < 0.01$ )。与心力衰竭组比较,辛伐他汀组兔心肌组织中 SIRT2 mRNA 相对表达量升高 ( $P < 0.01$ )。与正常组比较,心力衰竭组兔心肌组织中 NF-κB mRNA 相对表达量升高,辛伐他汀组兔心肌组织中 NF-κB mRNA 相对表达量降低,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ );与心力衰竭组比较,辛伐他汀组兔心肌组织中 NF-κB mRNA 相对表达量显著降低 ( $P < 0.01$ )。

表2 3组兔心肌 SIRT2 mRNA、NF-κB mRNA 相对表达量比较

Tab.2 Comparison of the relative expression of SIRT2 mRNA and NF-κB mRNA in myocardial cells of rabbits in the three groups

组别	n	SIRT2 mRNA 相对表达量	NF-κB mRNA 相对表达量
正常组	8	1.00 ± 0.32	1.00 ± 0.26
心力衰竭组	5	0.75 ± 0.29 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.28 <sup>b</sup>
辛伐他汀组	6	1.82 ± 0.62 <sup>bc</sup>	0.65 ± 0.37 <sup>bc</sup>

注:与正常组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与心力衰竭组比较<sup>c</sup> $P < 0.01$ 。

3 讨论

心力衰竭是由于心脏结构或功能异常导致心室

充盈或射血能力受损的一组复杂临床综合征,心力衰竭发病率高,近几年发病率仍在持续升高,成为重要的心血管疾病<sup>[2]</sup>。抗肿瘤药物阿霉素是蒽环类抗生素,具有抗癌谱广、抗癌作用强的特点,但阿霉素长期应用会引起心脏毒性,限制了其在临床的应用<sup>[3]</sup>。因此,如何减少阿霉素引起的心肌毒性成为临床研究热点。

NF-κB 是一种具有多向转录调节的核蛋白因子,存在于多种细胞中,参与许多基因调控,在炎症、细胞凋亡、免疫、氧化应激病理过程中发挥重要作用。NF-κB 具有促进细胞凋亡和抑制凋亡双重作用<sup>[4]</sup>。Sirtuins 去乙酰化酶家族是一类依赖于 NAD<sup>+</sup> 核心区域高度保守的蛋白去乙酰化酶和 ADP 核糖基转移酶,参与多种细胞活动,如细胞周期、染色体分离、微管组织、蛋白聚集物的运输、基因组稳定性、DNA 修复、细胞凋亡、自噬等<sup>[4-9]</sup>,与老年痴呆症、肥胖、2 型糖尿病、神经退行性疾病和癌症等多种疾病有关<sup>[10-14]</sup>。Sirtuins 去乙酰化酶家族包括 SIRT1 ~ SIRT7,其中 SIRT1 是目前研究最全面的 Sirtuins 蛋白,相关文献表明,他汀类药物在阿霉素引起心肌损伤的过程中对心肌起保护作用,其机制



可能与 SIRT1/NF- $\kappa$ B 信号通路有关<sup>[15]</sup>。SIRT2 与 SIRT1 有高度同源性,其在线粒体、细胞核、细胞质中均有表达,在细胞增殖、炎症、凋亡等过程中发挥重要作用<sup>[16-17]</sup>。有研究表明,SIRT2/NF- $\kappa$ B 信号通路在炎症和免疫介导的细胞损伤中发挥着重要作用,其可能机制为:SIRT2 使炎症中心 NF- $\kappa$ B 的 p65 亚基第 310 位赖氨酸脱乙酰化,进而抑制整个 NF- $\kappa$ B 活性,使依赖于 NF- $\kappa$ B 激活转录的炎性细胞因子释放受阻,减轻炎症反应<sup>[18]</sup>。他汀类药物能通过上调 SIRT1 抑制血管内皮衰老<sup>[19]</sup>,是否也可通过上调 SIRT2 表达而抑制 NF- $\kappa$ B 及其下游炎性相关因子的释放有待研究。因此,本研究通过建立阿霉素慢性心力衰竭兔模型,观察辛伐他汀对 SIRT2/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响。

本研究中,心脏超声检查结果显示,与正常组比较,心力衰竭组和辛伐他汀组兔的 LVEF 均降低,LVDd 均增高,提示阿霉素可引起兔心功能损伤;但辛伐他汀组兔的 LVEF 高于心力衰竭组,LVDd 低于心力衰竭组,说明辛伐他汀对阿霉素所致心功能损伤有保护作用。免疫组织化学和 RT-PCR 结果显示,与正常组比较,心力衰竭组兔心肌细胞 SIRT2 蛋白阳性表达率减少,辛伐他汀组兔心肌细胞 SIRT2 蛋白阳性表达率增高,且辛伐他汀组兔心肌细胞 SIRT2 蛋白阳性表达率高于心力衰竭组。与正常组比较,心力衰竭组兔心肌细胞 NF- $\kappa$ B 蛋白阳性表达率升高,辛伐他汀组兔心肌细胞 NF- $\kappa$ B 蛋白阳性表达率降低,且辛伐他汀组兔心肌细胞 NF- $\kappa$ B 蛋白阳性表达率低于心力衰竭组。与正常组比较,心力衰竭组兔心肌 SIRT2 mRNA 相对表达量降低,辛伐他汀组兔 SIRT2 mRNA 相对表达量升高;与心力衰竭组比较,辛伐他汀组兔 SIRT2 mRNA 相对表达量升高;与正常组比较,心力衰竭组兔 NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量升高,辛伐他汀组兔 NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量降低;与心力衰竭组比较,辛伐他汀组兔 NF- $\kappa$ B mRNA 相对表达量降低。以上结果提示,辛伐他汀可能通过上调 SIRT2 的表达,进而抑制 NF- $\kappa$ B 及其下游炎性相关因子的释放来保护心肌。

综上所述,辛伐他汀可能通过上调 SIRT2 的表达,进而抑制 NF- $\kappa$ B 及其下游炎性相关因子的释放,从而减轻阿霉素引起的心肌损害。

## 参考文献:

- [1] ROTHGIESSER K M, ERENER S, WAIBEL S, et al. SIRT2 regulates NF- $\kappa$ B. *J Cell Sci*, 2010, 123 (Pt 24): 4251-4258.
- [2] 韩额尔德木图, 马月宏, 王海燕, 等. 慢性心力衰竭的病理生理及发病机制研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(12): 1349-1352.
- [3] 张健, 金哲. 阿霉素心肌病的研究进展[J]. 中外医学研究, 2013, 11(13): 152-153.
- [4] 苏建东, 吴灵飞. NF- $\kappa$ B 与细胞凋亡[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(12): 1411-1416.
- [5] KIM H S, VASILOPOULOS A, WANG R H, et al. SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity[J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(4): 487-499.
- [6] VAQUERO A, SCHER M B, LEE D H, et al. SIRT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(10): 1256-1261.
- [7] SERRANO L, MARTINEZ-REDONDO P, MARAZUELA-DUQUE A, et al. The tumor suppressor SIRT2 regulates cell cycle progression and genome stability by modulating the mitotic deposition of H4K20 methylation[J]. *Genes Dev*, 2013, 27(6): 639-653.
- [8] NEWTON K, HILDEBRAND J M, SHEN Z, et al. Is SIRT2 required for necroptosis[J]. *Nature*, 2014, 506(7489): E4-E6.
- [9] RELIGA A A, WATERS A P. Sirtuins of parasitic protozoa: in search of function(s)[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2012, 185(2): 71-88.
- [10] HERRANZ D, MUÑOZ-MARTIN M, CAÑAMERO M, et al. SIRT1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer[J]. *Nat Commun*, 2010, 1(1): 3.
- [11] HAIGIS M C, SINCLAIR D A. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance[J]. *Annu Rev Pathol*, 2010, 5(1): 253-295.
- [12] LI X L, KAZGAN N. Mammalian sirtuins and energy metabolism[J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(5): 575-587.
- [13] SATOH A, STEIN L, IMAI S. The role of mammalian sirtuins in the regulation of metabolism, aging, and longevity[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011, 206(2): 125-162.
- [14] KAEBERLEIN M. Lessons on longevity from budding yeast[J]. *Nature*, 2010, 464(7288): 513-519.
- [15] 席振创, 王志蕴. 瑞舒伐他汀上调沉默信息调节因子 2 相关酶 1/核转录因子- $\kappa$ B 信号通路抑制阿霉素所致的心肌损伤的研究[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(12): 1029-1033.
- [16] 彭静, 李刚. Sirtuin 抗衰老相关的心血管疾病的研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2013, 7(8): 3549-3551.
- [17] LIN J, SUN B, JIANG C, et al. SIRT2 suppresses inflammatory responses in collagen-induced arthritis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 441(4): 897-903.
- [18] ROTHGIESSER K M, ERENER S, WAIBEL S, et al. SIRT2 regulates NF- $\kappa$ B dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123 (Pt 24): 4251-4258.
- [19] 雷军平, 张建君, 古小松, 等. 辛伐他汀通过上调 SIRT1 抵抗氧化低密度脂蛋白诱导的内皮细胞衰老[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(20): 3840-3844.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)