

【基础研究】

通信作者:陈 灿(1963-),男,广东茂名,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向:冠状动脉粥样硬化性心脏病的发病机制;
E-mail: chencan-21@163.com。

tein in myocardial tissues of rats in resveratrol group were significantly lower than those in AMI group ($P < 0.05$). The expressions of NF- κ B and I κ B α protein in myocardial tissues of rats in resveratrol group were significantly higher than those in sham operation group ($P < 0.05$), but there was no significant difference in the expression of IKK α protein in myocardial tissues of rats between resveratrol group and sham operation group ($P > 0.05$). **Conclusion** Resveratrol can protect the heart by inhibiting the expression of NF- κ B signal pathway in AMI rats.

Key words: resveratrol; acute myocardial infarction; nuclear factor- κ B signal pathway; cardioprotector

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 发病率、病死率呈逐年上升趋势, 为居民健康和社会带来严重负担^[1-2]。AMI 的发病机制与遗传、环境、氧化应激和炎症等心血管疾病危险因素有关^[3-5]。研究认为, 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 炎症信号通路参与了 AMI 的发生和发展^[6], 并导致 AMI 后室性心律失常的发生^[7]。白藜芦醇具有抗氧化应激、抗炎症反应、抗菌和促进凋亡等作用^[8-9], 且最近研究表明, 白藜芦醇的活性可能归因于其对 NF- κ B 信号通路的调控, 特别是抑制 NF- κ B 的活性^[10]。因此, 本研究采用 Sprague-Dawley 大鼠制作 AMI 模型, 并给予白藜芦醇干预, 以观察白藜芦醇对 AMI 大鼠 NF- κ B 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 30 只清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 6 个月龄, 体质量 180 ~ 220 g, 购自广东医学院实验动物中心。30 只大鼠随机分为假手术组、AMI 组和白藜芦醇组, 每组 10 只。

1.2 AMI 模型制备与标本采集 参照文献^[11-12]报道的方法制备大鼠 AMI 模型。3 组大鼠均给予戊巴比妥钠 50 mg \cdot kg⁻¹ 腹腔注射麻醉, 并行面罩通气支持呼吸, 通过左侧第 3 或第 4 肋间隙开胸暴露心脏, 打开心包; AMI 组和白藜芦醇组大鼠用 6-0 丝线结扎大鼠左冠状动脉前降支, 通过心电图 ST-T 段改变证实心肌缺血或者梗死; 假手术组大鼠只穿线, 而不结扎左冠状动脉前降支; 术闭逐层缝合, 关胸; 术后第 1 天白藜芦醇组大鼠腹腔注射白藜芦醇 10 mg \cdot kg⁻¹ \cdot d⁻¹, 假手术组及 AMI 组分别注射等剂量生理盐水; 每日 1 次, 持续用药至术后 4 周, 处死各组大鼠, 取心脏, 留取梗死区域的心肌组织, 快速冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱, 以备后续实验。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测 NF- κ B、I κ B α 及 IKK α mRNA 表达 取 50 mg 心肌组织加入 1 mL 的 TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司), 按照说明书操作步骤提取组织总 RNA, 分光光度计法测定总 RNA 的纯度及质量, 以吸光度 1.8 ~ 2.1 为合格; 然后按照

反转录试剂盒 [宝生物工程 (大连) 有限公司] 说明书将所提取的总 RNA 进行反转录, 再按照实时荧光定量 PCR 试剂盒 [宝生物工程 (大连) 有限公司] 说明书对相关基因进行荧光定量。NF- κ B、NF- κ B 抑制蛋白 α (NF- κ B inhibitor alpha, I κ B α)、I κ B 激酶 α (I κ B kinase alpha, IKK α) 及内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的 PCR 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司设计和合成。NF- κ B 引物序列: 上游为 5'-GAAGCA-CAGATACCACCAAGAC-3', 下游为 5'-GTCAGCCT-CATAGTAGCCATC-3'; I κ B α 引物序列: 上游为 5'-CAATCATCCACGAAGAGAAG-3', 下游为 5'-GCTTTCAGAACTGCCTCAG-3'; IKK α 引物序列: 上游为 5'-CAAAGAACAGAGACCGCTGGTG-3', 下游为 5'-GCAGTGGCAAATCATTGGGTG-3'; GAPDH 引物序列: 上游为 5'-TGCCCCCATGTTTGTGATG-3', 下游为 5'-TGTGGTCATGAGCCCTTCC-3'。结果分析采用 2^{- Δ CT} 相对定量分析方法。

1.4 Western blot 法检测大鼠心肌组织中 NF- κ B、I κ B α 和 IKK α 蛋白表达 采用蛋白裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司) 提取心肌组织总蛋白质, 进行电泳后转印到聚偏氟乙烯膜, 应用含 50 g \cdot L⁻¹ 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h 后, 加入美国 Santa Cruz 公司生产的大鼠单克隆 GAPDH 一抗 (1 : 500)、NF- κ B 一抗 (1 : 200)、I κ B α 一抗 (1 : 200)、IKK α 一抗 (1 : 200) 后 4 $^{\circ}$ C 过夜; 第 2 天复温 1 h 后, 二抗孵育 2 h; 免疫印迹化学发光液显影, 暗房曝光, 以目的条带与 GAPDH 条带灰度值的比值评定蛋白表达水平。

1.5 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5 软件 (美国 GraphPad 软件有限公司) 进行数据分析, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠造模情况 3 组大鼠实验期间生长情况良好, AMI 组和白藜芦醇组大鼠各死亡 1 只, 假手术

组大鼠未死亡。造模成功心电图见图 1,AMI 组和白藜芦醇组大鼠心电图 ST-T 段明显升高,且 AMI 组 6 只大鼠出现室性心律失常,白藜芦醇组 5 只大鼠出现室性心律失常;而假手术组大鼠心电图大致正常。

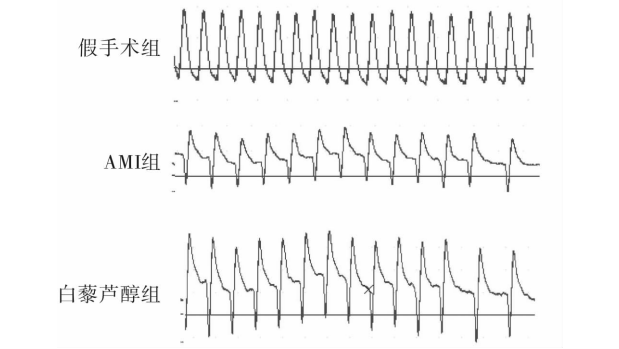


图 1 3 组大鼠造模后心电图表现

Fig. 1 Electrocardiogram of rats after modeling in the three groups

2.2 3 组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 和 IKKα mRNA 表达比较 结果见表 1。AMI 组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 和 IKKα mRNA 表达显著高于假手术组 ($P < 0.05$),白藜芦醇组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 和 IKKα mRNA 表达显著低于 AMI 组 ($P < 0.05$),白藜芦醇组与假手术组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 和 IKKα mRNA 表达比较差异均无统计学意见 ($P > 0.05$)。

表 1 3 组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 和 IKKα mRNA 表达比较

Tab. 1 Comparison of the expressions of NF-κB, IκBα and IKKα mRNA in myocardial tissues of rats in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NF-κB mRNA	IκBα mRNA	IKKα mRNA
假手术组	10	0.055 ± 0.020	0.059 ± 0.018	0.184 ± 0.020
AMI 组	9	0.223 ± 0.056 ^a	0.278 ± 0.082 ^a	0.339 ± 0.053 ^a
白藜芦醇组	9	0.092 ± 0.037 ^b	0.058 ± 0.013 ^b	0.193 ± 0.024 ^b
<i>F</i>		18.472	3.552	5.534
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$;与 AMI 组比较^b $P < 0.05$ 。

2.3 3 组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 和 IKKα 蛋白表达比较 结果见图 2 和表 2。AMI 组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 和 IKKα 蛋白表达显著高于假手术组 ($P < 0.05$),白藜芦醇组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 和 IKKα 蛋白表达显著低于 AMI 组 ($P < 0.05$);白藜芦醇组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 蛋白表达显著高于假手术组 ($P < 0.05$),但 2 组大鼠心肌组织中 IKKα 蛋白表达比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

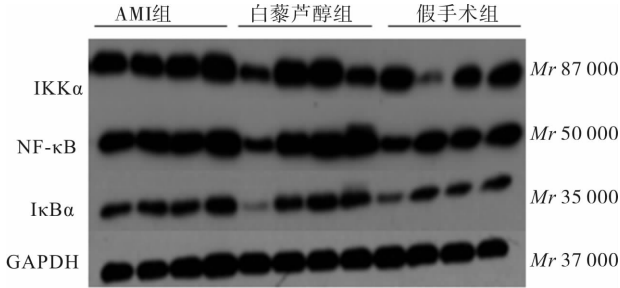


图 2 3 组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 和 IKKα 蛋白表达
Fig. 2 Expressions of NF-κB, IκBα and IKKα protein in myocardial tissues of rats in the three groups

表 2 3 组大鼠心肌组织中 NF-κB、IκBα 和 IKKα 蛋白表达比较

Tab. 2 Comparison of the expressions of NF-κB, IκBα and IKKα protein in myocardial tissues of rats in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NF-κB	IκBα	IKKα
假手术组	10	0.769 ± 0.070	0.223 ± 0.027	0.763 ± 0.092
AMI 组	9	1.719 ± 0.097 ^a	0.513 ± 0.025 ^a	1.571 ± 0.042 ^a
白藜芦醇组	9	1.294 ± 0.069 ^{ab}	0.348 ± 0.011 ^{ab}	1.021 ± 0.129 ^b
<i>F</i>		35.08	40.92	18.72
<i>P</i>		<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较^a $P < 0.05$;与 AMI 组比较^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

AMI 是冠状动脉粥样硬化性心脏病患者死亡的重要原因,是在冠状动脉粥样硬化病变的基础上,发生冠状动脉血供急剧减少或中断,使相应的心肌严重而持久地急性缺血,导致心肌坏死,为患者个人、家庭、社会带来了严重负担^[13-14]。NF-κB 是与心血管疾病相关的主要转录因子之一,研究表明,NF-κB 在动脉粥样硬化、心肌缺血/再灌注损伤等 AMI 相关疾病中起关键作用,其具体机制主要是通过调控炎症及氧化应激等。NF-κB 是一种分布广泛、功能强大的真核细胞转录因子,其能调控细胞因子、免疫受体、酶及其他促炎症反应分子的基因表达^[15-16]。人体内 NF-κB 信号通路的激活有 2 种途径:经典途径和选择性途径,其经典途径主要为致炎细胞因子(如肿瘤坏死因子、白细胞介素-1)和脂多糖触发,激活 IκB 激酶复合物,使 IκBα 特异性 N-末端丝氨酸残基发生磷酸化,导致 NF-κB 二聚体从 IκBα/p50/p65 复合物中解离,活化转移至细胞核,与核内多种基因的启动子结合,诱导靶基因的表达^[17-18]。

白藜芦醇为多酚化合物,具有抗炎、抗肿瘤、抗血小板聚集、抗氧化和免疫调节等多种生物活性^[19-20]。研究发现,白藜芦醇可以改善心肌梗死大

鼠心脏神经重构,并证实白藜芦醇可以通过抗氧化和抗炎发挥作用^[21]。NF- κ B 信号通路是炎症反应及氧化应激反应的关键环节^[22],因此,本研究针对 AMI 大鼠心肌组织中 NF- κ B 信号通路的表达以及白藜芦醇对其干预作用进行研究。本研究结果显示,AMI 组大鼠心肌组织中 NF- κ B、I κ B α 和 IKK α 蛋白及 mRNA 表达显著高于假手术组,该结果提示 AMI 后 NF- κ B 信号通路关键因子升高,而白藜芦醇可以抑制该效应,且在第 4 周时 NF- κ B 和 I κ B α 在白藜芦醇的作用下并未完全恢复正常水平,还可以适当延长用药时间;白藜芦醇组大鼠心肌组织中 NF- κ B、I κ B α 和 IKK α 蛋白及 mRNA 表达显著低于 AMI 组;说明 AMI 后 NF- κ B 信号通路会激活,NF- κ B、I κ B α 、IKK α 在基因和蛋白的表达均会升高,而白藜芦醇具有抑制 NF- κ B 信号通路高表达的作用。NF- κ B 家族与多个反应过程相关,包括免疫、炎症、细胞存活、分化及增殖,以及调节细胞对于缺血、缺氧等刺激的反应,而白藜芦醇具有抗氧化应激、炎症反应、抗菌和促进凋亡等作用,白藜芦醇有可能是通过调控 NF- κ B 经典途径发挥作用。

综上所述,AMI 后 NF- κ B 信号通路激活,NF- κ B、I κ B α 、IKK α 在基因和蛋白水平的表达都会升高,而白藜芦醇具有改善 NF- κ B 信号通路高表达的作用。然而,本研究只是对白藜芦醇改善 AMI 大鼠 NF- κ B 信号通路的一个初步研究,其具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2014》概要[J]. 中国循环杂志,2015,30(7):617-622.
- [2] MOZAFFARIAN D,BENJAMIN E J,GO A S,*et al.* Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*,2015,131(4):e29-e322.
- [3] NABEL E G,BRAUNWALD E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction[J]. *N Engl J Med*,2012,366(1):54-63.
- [4] FANG L,MOORE X L,DART A M,*et al.* Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction[J]. *J Geriatr Cardiol*,2015,12(3):305-312.
- [5] KARBACH S,WENZEL P,WAISMAN A,*et al.* eNOS uncoupling in cardiovascular diseases: the role of oxidative stress and inflammation[J]. *Curr Pharm Des*,2014,20(22):3579-3594.
- [6] GORDON J W,SHAW J A,KIRSHENBAUM L A. Multiple facets of NF- κ B in the heart; to be or not to NF- κ B[J]. *Circ Res*,2011,

- 108(9):1122-1132.
- [7] 张涛,商丽华. 心肌梗死后交感神经重构与室性心律失常[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志,2012,26(5):383-385.
- [8] KHURANA S,VENKATARAMAN K,HOLLINGSWORTH A,*et al.* Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging[J]. *Nutrients*,2013,5(10):3779-3827.
- [9] WANG H,YANG Y J,QIAN H Y,*et al.* Resveratrol in cardiovascular disease: what is known from current research[J]. *Heart Fail Rev*,2012,17(3):437-448.
- [10] LEDOUX A C,PERKINS N D. NF- κ B and the cell cycle[J]. *Biochem Soc Trans*,2014,42(1):76-81.
- [11] 卢新林,岳玉霞,严泉祥,等. 在无创性通气条件下快速建立小鼠心肌梗死模型的简易方法[J]. 中国医学创新,2014,11(30):23-26.
- [12] 许云俊,李兴岳,卢新林,等. 冠脉显色指导下冠脉结扎法在制作大鼠心肌梗死模型中的应用[J]. 中国医学创新,2015,12(12):22-25.
- [13] FUSTER V,余国膺. 今后 10 年最重要的心血管治疗和干预之一:促进心血管健康[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志,2015,29(3):235.
- [14] FUSTER V,余国膺. 今后 10 年最重要的心血管治疗和干预之一:ST 段抬高病人的心肌保护[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志,2015,29(3):212.
- [15] 张弛,赵刚平,陈俊杰,等. 人睫状肌细胞中核转录因子抑制因子- α 与基质金属蛋白酶-2 作用机制研究[J]. 眼科新进展,2015,35(5):424-428.
- [16] 俞敏,唐云,赵赛,等. 晚期糖基化终末产物受体-核因子 κ B 信号通路在脂多糖致新生大鼠急性肺损伤的作用[J]. 中华实用儿科临床杂志,2015,30(14):1083-1086.
- [17] KAO W P,YANG C Y,SU T W,*et al.* The versatile roles of CARDs in regulating apoptosis, inflammation, and NF- κ B signaling[J]. *Apoptosis*,2015,20(2):174-195.
- [18] PATERAS I,GIAGINIS C,TSIGRIS C,*et al.* NF- κ B signaling at the crossroads of inflammation and atherogenesis: searching for new therapeutic links[J]. *Expert Opin Ther Targets*,2014,18(9):1089-1101.
- [19] 马毅,曹军平,树俊莲,等. 白藜芦醇对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织中核因子- κ B 表达的影响[J]. 新乡医学院学报,2015,32(9):829-832.
- [20] 刘海凤,张向东,杨洋. 白藜芦醇对青光眼视网膜氧化损伤的保护作用[J]. 眼科新进展,2014,34(8):732-734.
- [21] XIN P,PAN Y,ZHU W,*et al.* Favorable effects of resveratrol on sympathetic neural remodeling in rats following myocardial infarction[J]. *Eur J Pharmacol*,2010,649(1/2/3):293-300.
- [22] 庞珍珍,詹合琴,陈正跃,等. 甜叶菊正丁醇提取物对抑郁小鼠肝脏单一免疫球蛋白白介素 1 受体相关蛋白和核转录因子 κ B 表达的影响[J]. 中华实用儿科临床杂志,2016,31(19):1480-1483.

(本文编辑:徐自超 英文编辑:徐自超)