

3 种不同治法方药对大鼠心肌缺血再灌注 损伤核因子- κ B 信号转导通路的影响

唐丹丽¹, 刘寨华², 隋宇¹, 佟林³, 张华敏^{3*}

(1. 中国中医科学院医学实验中心, 北京 100700; 2. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700; 3. 中国中医科学院中医药信息研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察中医不同治法方药对大鼠心肌缺血再灌注损伤(I/R)核因子- κ B(NF- κ B)信号转导通路的影响。方法: 将 60 只 SD 大鼠随机分为 5 组: 假手术组、模型组、祛痰宽胸组、活血化瘀组及痰瘀同治组。可逆性冠脉左前降支结扎缺血 30 min 再灌注 2 h 复制 I/R 模型, 应用 Western blotting 及 RT-PCR 法检测各组大鼠心肌核因子 I κ B 诱导激酶(NIK)、I κ B 激酶 β (IKK β)、核转录因子抑制蛋白(I κ B α)及 NF- κ Bp65 mRNA 的表达。结果: 与模型组比较, 各治疗组均能降低心肌 NIK, IKK β , NF- κ Bp65 mRNA 水平并上调 I κ B α 蛋白表达($P < 0.01$)。结论: 祛痰宽胸法、活血化瘀法及痰瘀同治法均对 I/R 大鼠有保护作用, 其主要作用机制可能是通过抑制 NIK, IKK β 蛋白表达, 减少 I κ B α 蛋白的磷酸化降解而增加其蛋白水平, 从而抑制 NF- κ B 的过度活化, 发挥其对缺血再灌注损伤心肌的保护作用。

[关键词] 不同中医治法; 心肌缺血再灌注损伤; 信号转导通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0161-04

Comparative Studies on Effects of Three Different Chinese Medicine Treatments on NF- κ B Signal Transduction Pathway of Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in Rats

TANG Dan-li¹, LIU Zhai-hua², SUI Yu¹, TONG Lin³, ZHANG Hua-min^{3*}

(1. *Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;*
2. *Institute of Basic Theories of Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences,*
Beijing 100700, China; 3. *Institute of Information on Chinese Medicine, China Academy of*
Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the influence of different Chinese medicine treatments on NF- κ B signal transduction pathway of myocardial ischemia-reperfusion(I/R) injury in rats. **Method:** Sixty SD rats were divided into 5 groups randomly, sham-operated group; model group, removing phlegm and enlarging chest group, activating blood and dissolving stasis group, treating both phlegm and blood stasis group. The model of I/R of the myocardium was reproduced by ligation of left descending artery for 30 min followed by releasing the ligation for 2 hours in rats. NIK, IKK β and I κ B α protein expression of myocardial tissues in rats were detected by Western blotting method. And the levels of NF- κ Bp65 mRNA were determined with RT-PCR. **Result:** Compared with model group, the expression of NIK, IKK β and NF- κ Bp65 mRNA were lower, and the protein expression of I κ B α was increased in all groups treated by different Chinese medicine treatments ($P < 0.01$). **Conclusion:** The removing phlegm and

[收稿日期] 2010-05-25

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30701066)

[第一作者] 唐丹丽, 助理研究员(博士), 研究方向: 中医药防治心血管病研究, Tel: 010-84075618, E-mail: tangdanli@hotmail.com

[通讯作者] * 张华敏, 副研究员(博士), 研究方向: 中医药防治心血管病研究, Tel: 010-64010953, E-mail: huaminzhang@hotmail.com

enlarging chest method, activating blood and dissolving stasis method, treating both phlegm and blood stasis method can protect myocardium from I/R. The mechanism of action was related to inhibiting the protein expression of NIK, IKK β and enhancing the expression of I κ B α , restraining the activation of NF- κ B.

[Key words] different Chinese medicine treatments; myocardial ischemia-reperfusion injury; signal transduction pathway

细胞信号转导是指细胞通过细胞表面或胞内受体接受外界信号,再经系统级联传递机制,将胞外信号转导为胞内信号,最终引起细胞生理反应或诱导特定基因的表达,引起细胞的应答反应。信号转导系统是由能接受信号的特定受体,受体后的信号转导途径及其作用效应所组成。它不仅是细胞生长、分化和物质代谢等各种功能活动的调控系统,而且也是细胞对应激原的反应以及细胞凋亡的调控系统^[1-2]。

心肌缺血再灌注损伤(I/R)是一个复杂的病理过程,在其发生、发展和转归中细胞信号转导系统存在着广泛而复杂的交汇和网络调控。深入认识 I/R 的细胞信号转导途径,不仅有助于阐明其细胞分子机制,对于 I/R 临床防治也具有积极的推动作用。本课题前期研究发现祛痰宽胸法、活血化瘀法及痰瘀同治法均对 I/R 大鼠有保护作用,且痰瘀同治组在减轻心肌超微结构的损伤、降低血清心肌酶水平、抑制核转录因子 NF- κ Bp65 的活化及炎症因子 IL-1, IL-6, TNF- α , ICAM-1 等表达方面效果尤为显著^[3-5]。为进一步揭示其具体作用机制,本试验即以 NIK/NF- κ B 信号通路为切入点,以痰瘀同治、活血化瘀及祛痰宽胸等治法为干预手段,探讨不同治法方药防治 I/R 的作用机制,为 I/R 的临床防治提供新的思路。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠 50 只,体重(300 \pm 20) g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供,许可证号 SCXK-(军)2007-004。

1.2 试剂与药物 NIK, IKK β , I κ B α 抗体,均购自美国 Cell Signaling 公司;HRP 标记二抗, Santa Cruz 公司;总 RNA 提取试剂盒(Sangon RNA Kit)、一步法 PCR 反转录试剂盒 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0,均购自上海生物化学试剂公司。瓜蒌薤白半夏汤由按原方比例(瓜蒌 24 g,薤白 9 g,半夏 12 g,白酒 24L^[6])组成;血府逐瘀汤按原方比例(当归 9 g,生地黄 9 g,桃仁 12 g,红花 9 g,枳壳 6 g,赤芍 6

g,柴胡 3 g,桔梗 5 g,川芎 5 g,牛膝 9 g,甘草 3 g^[7])组成;痰瘀同治方以上述两方为基础,由瓜蒌、薤白、半夏、赤芍、川芎等 11 味中药按原方比例组成,3 方分别浓缩成含生药量 1.3, 2.2, 2.15 g \cdot mL⁻¹的水煎液,中药材购自亳州市芳益堂药业有限责任公司。药物剂量换算依 70 kg 成人每日 1 剂用量换算出大鼠 1 日用量(相当于人用剂量的 20 倍)。

1.3 仪器 多道生理信号采集处理系统 RM6240BD,成都仪器厂;全自动生化分析仪 HITACHI7080,日本 HITACHI 公司;Mini-ROTEAN3 电泳系统与 Mini Trans-Blot 转移系统,美国 Bio-Rad 公司;Gene II 型 DNA/RNA 测定仪,瑞典 Pharmacia biosystem 公司;GeneAmp 9600 型普通 PCR 仪,美国应用生物公司。

2 方法

2.1 造模方法 大鼠术前 12 h 禁食,不禁水。ip 20% 乌拉坦(5 mL \cdot kg⁻¹)麻醉后仰卧位固定。记录 II 导心电图。颈部、胸前手术野备皮,切开气管,连接动物呼吸机(呼吸频率 70 次/min,吸呼比 1:2,潮气量 9 mL \cdot kg⁻¹)。自左侧 3~4 肋间剪开皮肤,钝性分离肌肉组织,打开胸腔,剪开心包膜,于左心耳与肺动脉圆锥之间找出冠状动脉左前降支,并以 5-0 号丝线结扎分支起点外约 1~2 mm,(在丝线与心肌间放一根聚乙烯小管),此时缺血心肌壁呈现发绀、膨出,同时记录心电图,以标准肢导联 II 导联 ST 段弓背上抬, T 波高耸,显示心肌缺血形成。30 min 后松开结扎,使缺血冠脉再灌注,关闭胸腔,再灌注 120 min,心电图示 ST 段回落 1/2 以上。结扎前心电图不正常,或未观察到观察终点而死亡以及造模不成功者剔除。

2.2 分组及给药 将 50 只大鼠随机分 5 组,每组 10 只,分别为假手术组、模型组、祛痰宽胸组(瓜蒌薤白汤、活血化瘀组(血府逐瘀汤)及痰瘀同治组。各组动物常规饲养,条件相同。各组分别按 10 mL \cdot kg⁻¹予生理盐水或药物 ig, 1 次/d,连续给药 3 周。

2.3 标本采集及检测 末次药后 2 h 再灌注 2 h 后

腹主动脉取血,之后迅速剪取心脏,预冷生理盐水冲洗,冰盘上切取部分左冠状动脉供血区心肌组织,称重后于液氮中迅速冰冻,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测心肌组织中 NIK, IKK β , I κ B α 蛋白表达,逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测心肌 NF- κ Bp65 mRNA 表达。

2.4 Western blotting 检测步骤 取大鼠心肌组织标本 100 mg 剪碎,加入裂解液,经匀浆离心后,取上清液用 Bradford 法测定蛋白浓度,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取各组样品 50 μg ,进行 15% SDS-PAGE 并电转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,加入 TBST 稀释的 1:2 000 相应抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜,用 TBST 洗涤,10 min \times 2 次。然后,加入二抗 (HRP 标记二抗),室温下孵育 1 h 后,用 TBST 洗涤,10 min \times 2 次。ECL 发光液显色,胶片扫描后用 Quantity One 软件进行图像分析,以 β -actin 作为内参照对比,比值结果表示其蛋白的相对含量。

2.5 RT-PCR 检测步骤 NF- κ Bp65 mRNA 表达按 Trizol 常规一步法试剂盒说明提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA,按试剂盒说明操作。以 cDNA 为模板加入 TaqDNA 合成酶,10 \times Buffer, MgCl $_2$, dNTP 和上下游引物进行 PCR 反应,每管 PCR 反应体系中均加入内参照引物 GAPDH 和 NF- κ Bp65 引物。PCR 扩增:大鼠 NF- κ Bp65 cDNA 序列合成的引物及内参 GAPDH 引物分别为 NF- κ Bp65 引物 forward primer 5'-ATGGACGATCTGTTCCCT-3', reverse primer 5'-GGTGCCTAGTGGTATCT-3', GAPDH 引物 forward primer 5'-CCTTCATGACCTCAACTACATG-3', reverse primer 5'-CTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min 后,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,30 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,扩增片段为 288 bp 及 216 bp。取扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,采用 Pharmacia Biotech 凝胶成像系统观察拍照,并应用 ImageMaster VDS software 对各靶基因条带进行定量分析,读取各靶基因的累计吸光度 (integrated optical density, IA) 值,并以靶基因/GAPDH 的 IA 比率表示 NF- κ Bp65 mRNA 的相对表达水平。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用 One-way ANOVA 分析,两两比较用 LSD 或 Tamhane's T2 法。

3 结果

3.1 各组大鼠心肌 NIK 蛋白表达 假手术组 NIK 蛋白表达较弱,模型组较之明显升高 ($P < 0.01$);各治疗组均能不同程度地下调其表达水平,与模型组比较 $P < 0.01$,且以活血化瘀组下调效果最为明显,但各治疗组间比较无统计学差异,见图 1。

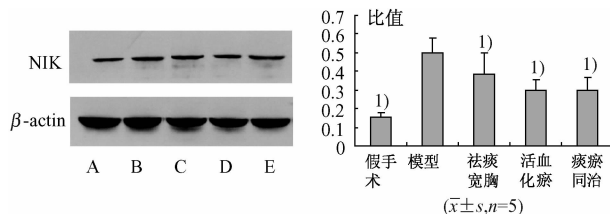


图 1 各组 NIK 蛋白表达条带

A. 假手术;B. 模型;C. 祛痰宽胸;
D. 活血化瘀;E. 痰瘀同治 (图 2~4 同)
与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$ (图 2~4 同)。

3.2 各组大鼠心肌 IKK β 蛋白表达 与假手术组相比,各组 IKK β 蛋白表达均有所增高,并以模型组表达最强 ($P < 0.01$);各治疗组均可下调 IKK β 蛋白的表达,与模型组比较 $P < 0.01$,但各治疗组间作用无明显差别,见图 2。

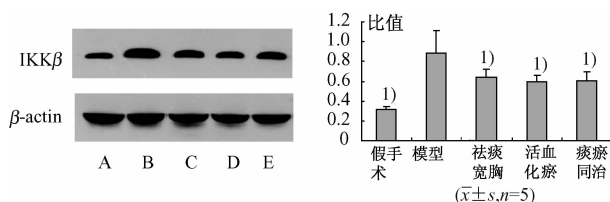


图 2 各组 IKK β 蛋白表达条带

3.3 各组大鼠心肌 I κ B α 蛋白表达 模型组 I κ B α 蛋白表达较假手术组明显降低 ($P < 0.01$);各治疗组均能显著增加心肌内 I κ B α 蛋白的表达,与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.01$),且活血化瘀组疗效明显优于其他两组 (均 $P < 0.01$),见图 3。

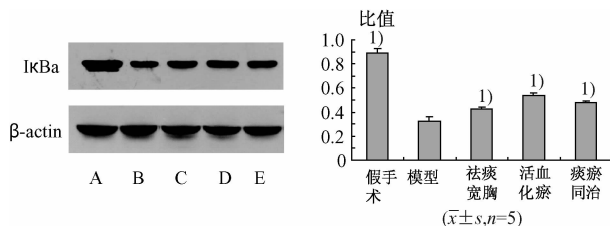


图 3 各组 I κ B α 蛋白表达条带

3.4 各组大鼠心肌 NF- κ Bp65 mRNA 表达 假手术组心肌组织 NF- κ Bp65 mRNA 表达极弱,模型组大鼠心肌组织 NF- κ Bp65 mRNA 含量增加,与假手术组比较 $P < 0.01$ 。各治疗组均可降低心肌 NF- κ Bp65

mRNA 表达含量,与模型组比较 $P < 0.01$,各治疗组间差异无统计学意义,但从均值分析活血化瘀组优于其他 2 组,见图 4。

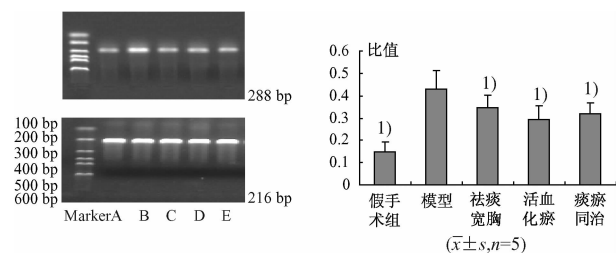


图 4 各组 NF-κBp65 mRNA 表达

4 讨论

心肌缺血和再灌注时产生的氧自由基通过一系列信号转导可引起转录因子激活物(NIK, IKK)和抑制蛋白(IκB)的解离,导致 NF-κB 得到活化,活化后的 NF-κB 能调控一系列基因的表达^[7],具有这些启动子/增强子的基因有 IL-1, IL-6, TNF-α 等。在这些递质的作用下,中性粒细胞在缺血区血管中黏附、聚集,造成管腔阻塞。再灌注后黏附分子表达进一步增加,同时吸引更多中性粒细胞、淋巴细胞黏附聚集形成自我增殖的恶性循环,引起血管内皮细胞和心肌细胞损伤^[8]。因此,NIK/IKK/IκB/NF-κB 信号转导通路的激活与否关系到 I/R 的发生、发展、发病程度及转归,适度干预其活化将会对缺血性心肌损伤的临床治疗产生积极的作用。

本研究结果表明,I/R 模型组 NIK, IKKβ 蛋白表达较假手术组明显上调($P < 0.01$),同时 IκBα 蛋白的水平低于假手术组($P < 0.01$)。同时间检测心肌 NF-κBp65 mRNA 基因显示,模型组 NF-κBp65 mRNA 表达水平与假手术组比较显著增加($P < 0.01$),部分证实 I/R 可以通过上调 NIK 信号分子的表达,发生级联反应激活了 IKKβ,加速 IκB 降解从而激活 NF-κBp65,促进 I/R 病理过程的发生、发展。各给药组心肌 NIK, IKKβ 蛋白表达较模型组显著下降($P < 0.01$),且 IκBα 表达增加($P < 0.01$),NF-κBp65 mRNA 表达与模型组比较较弱($P < 0.01$),组间比较无明显差异,但对于上调 IκBα 表达的作用,

活血化瘀组明显优于其他 2 组($P < 0.01$)。结果提示,活血化瘀、祛痰宽胸法及痰瘀同治法及其方药在 I/R 防治中具有重要的作用,其主要作用机制可能是通过一定程度上抑制 NIK, IKKβ 蛋白表达,减少 IκBα 蛋白的磷酸化降解而增加其蛋白水平,从而抑制 NF-κB 的过度活化,发挥其对缺血再灌注损伤心肌的保护作用。综合各项指标数据,各治疗组之间进行比较,活血化瘀组略优于其他 2 组,但不具统计学意义。分析其原因可能是由于本试验缺血再灌注为急性损伤过程,且本次只观察了单一时间点的特定指标变化,尚难以比较出各法的优势所在。研究不同治法,以及中药复方不同剂量在再灌注不同时间点的效应及其内在机制,将是今后研究的方向。

[参考文献]

- [1] 黄文林,朱孝峰. 信号转导[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:1.
- [2] 刘胜中,杨双强. 心肌缺血/再灌注损伤与细胞信号转导[J]. 心脏杂志,2008,20(2):223.
- [3] 张华敏,唐丹丽,唐健伟,等. 中医不同治法对心肌缺血再灌注损伤大鼠炎症因子影响的比较研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2009,15(3):182.
- [4] 唐丹丽,张华敏,刘治中,等. 中医不同治法对大鼠心肌缺血再灌注损伤心肌 NF-κB 表达及血清炎症因子释放的影响[J]. 中国中医基础医学杂志,2009,15(10):736.
- [5] 唐丹丽,张华敏,孙明杰,等. 不同治法方药对心肌缺血再灌注损伤大鼠防治作用的对比观察[J]. 国际中医中药,2009,31(6):485.
- [6] 苗明三,王升启. 现代方剂学[M]. 北京:清华大学出版社,2004:1621,1718.
- [7] Baeuerle P A, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system[J]. Annu Rev Immunol, 1994,12:141.
- [8] Li C, Browder W, Kao R. Early activation of transcription factor NF-κB during ischemia in perfused rat heart[J]. Am J Physical, 1999,276:H543.

[责任编辑 何伟]