

# Intermedin 对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注炎症细胞因子的影响

李虹, 高奋, 边云飞, 李瑾, 白瑞, 肖传实

(山西医科大学第二医院心血管内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] Intermedin; 糖尿病大鼠; 心肌缺血再灌注; 炎症细胞因子

[摘要] **目的** 观察 Intermedin 对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注后炎症细胞因子的影响, 从而进一步探讨 Intermedin 对糖尿病心肌缺血再灌注损伤保护作用的机制。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 74 只, 给予适应性饲养一周后, 将 74 只雄性 SD 大鼠随机分为糖尿病组(50 只)和非糖尿病组(24 只)。非糖尿病组给予枸橼酸缓冲液腹腔注射, 糖尿病组建立糖尿病大鼠模型, 通过腹腔注射链脲佐菌素复制 I 型糖尿病大鼠模型。然后阻断大鼠冠状动脉左前降支 30 min 制备心肌缺血再灌注损伤模型。将成功造模的大鼠随机分为 5 个实验组: 对照组(NS)、缺血再灌注组(NIR)、糖尿病组(DS)、糖尿病缺血再灌注组(DIR)和应用 Intermedin 干预的治疗组(IMD)。应用 ELISA 法测定血清中炎症细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的含量。应用 RT-PCR 法检测心肌组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的 mRNA 的表达。免疫组织化学 S-P 法和 Western-blot 检测心肌组织 NF- $\kappa$ B 的表达。**结果** 与各自对照组和糖尿病组比较, NIR 组与 DIR 组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量升高( $P < 0.05$ )。但是同 DIR 组比较, IMD 组大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量则明显降低。( $P < 0.05$ )。NIR 组和 DIR 组大鼠心肌组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  mRNA 表达与各自对照组和糖尿病组比较均明显增强( $P < 0.05$ )。IMD 组 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  mRNA 表达比 DIR 组明显减弱( $P < 0.05$ )。免疫组织化学结果显示, 当心肌缺血再灌注后其心肌组织中可观察到核移位的现象, 即在 NIR 组和 DIR 组中 NF- $\kappa$ B 活化增强, 阳性颗粒出现在胞浆和胞核。而在对照组和糖尿病组大鼠心肌组织中观察到 NF- $\kappa$ B 呈低表达状态, 并且阳性表达出现在胞浆中。同 DIR 组相比较, IMD 组 NF- $\kappa$ B 的表达活性将低, 阳性表达的细胞数明显减少( $P < 0.05$ )。Western blot 结果显示: 分别与对照组和糖尿病组相比较, NIR 组和 DIR 组 NF- $\kappa$ B 表达量均显著增加( $P < 0.05$ ), 而 IMD 组 NF- $\kappa$ B 表达显著低于 DIR 组( $P < 0.05$ )。**结论** Intermedin 对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注具有保护作用, 其部分保护作用机制可能与 intermedin 可以抑制 NF- $\kappa$ B 活化, 从而减少炎症因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的表达, 减轻炎症反应有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## The Effects of Intermedin on Inflammatory Response Induced by Myocardium Ischemia Reperfusion in Diabetic Rats

LI Hong, GAO Fen, BIAN Yun-Fei, LI Jin, BAI Rui, and XIAO Chuan-Shi

(Cardiovascular Department, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Intermedin; Diabetic Rats; Myocardium Ischemia Reperfusion; Inflammatory Factors

[ABSTRACT] **Aim** To observe the change of activation of myocardial NF- $\kappa$ B and its downstream inflammatory factors such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), whiteinterleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and whiteinterleukin-6 (IL-6) after myocardium ischemia reperfusion in diabetic rat and its mechanism. **Methods** 74 healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into diabetics group ( $n = 50$ ) and non-diabetics group ( $n = 24$ ). Experimental diabetes was induced in the animals by a single intraperitoneal administration of STZ dissolved in 0.1 mol/L citrate buffer (pH 4.5) at a dose of 55 mg/kg. Normal rats received an equal volume of citrate buffer. Three days post-STZ injection, tail vein blood glucose samples were collected and measured with Onetouchglucometer (Johnson & Johnson, USA). The rats were considered diabetic and used for the study only if their glucose levels were greater than 15 mmol/L. Rats were housed 8 weeks after vehicle or STZ injection.

[收稿日期] 2015-07-10

[修回日期] 2015-08-30

[基金项目] 山西省卫生厅科技攻关计划项目(20130106)

[作者简介] 李虹, 博士, 讲师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 13753499688@139.com。高奋, 博士, 副教授, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 gaofen555@sina.com。边云飞, 博士, 教授, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 yunfeibian@sina.com。通讯作者肖传实, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 806963984@qq.com。

Animals were anesthetized intraperitoneally with pento-barbital sodium (50 mg/kg) followed by a tracheotomy and an artificial ventilation. The left femoral vein was cannulated for administration of drugs. A fourth-intercostal space thoracotomy was performed, and the pericardium was excised to expose the heart. The artery was occluded for 30 min by tightening the ligature. The rats in non-diabetic group were randomly reassigned into sham-operated group (NS), I/R group (NIR), the rats in diabetic group were randomly reassigned into sham-operated group (DS), I/R group (DIR) and intermedin groups ( $n = 12$ ). Determine the content of tumor necrosis factor alpha in (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) and interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ) in serum with ELISA method. Determine mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in myocardial tissue with real time fluorescent quantitative PCR. The translocation of NF- $\kappa$ B in the cardiomyocytes was detected by immunohistochemistry and the protein expression of NF- $\kappa$ B was determined with western blot.

**Results** In NIR and DIR group, the content of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 in serum was significantly higher than that in their respective control groups ( $P < 0.05$ ). In DS and DIR group, the above indexes were significantly higher than those in NS and NIR group ( $P < 0.05$ ). The content of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in serum of the rats in group IMD is lower than that of DIR group ( $P < 0.05$ ). After ischemia and reperfusion, the mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  in myocardial tissues in NIR group and DIR were significantly enhanced than that of their respective control groups, NS group and DS group ( $P < 0.05$ ). In IMD group, the expression of mRNA of IL-6, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  decreased obviously than that of DIR group ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemical results show: NF- $\kappa$ B in myocardial tissues showed low expression state in NS group and DS group, and the positive expression appeared in the cytoplasm. In NIR and DIR group, the NF- $\kappa$ B activated, enhanced expression, positive granules appeared in cytoplasm and nucleus, that is the nuclear translocation. NF- $\kappa$ B activity of IMD group is lower than that of the DIR group. The positive number of nuclei expression is significantly less ( $P < 0.05$ ). After ischemia reperfusion, the NF- $\kappa$ B cell shift from the plasma to the nucleus is limited. The Western blot results show: the NF- $\kappa$ B expression of the NIR and the DIR group were significantly increased after ischemia and reperfusion compared with NS and DS group ( $P < 0.05$ ). The protein expression of NF- $\kappa$ B in IMD group was significantly lower than that in DIR group ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Intermedin on diabetic rats plays a protective role in myocardial ischemia reperfusion, some of its protection mechanism may be related to Intermedin which can inhibit the nf-kappa B activation, thus decrease the inflammatory factors such as: TNF alpha, beta IL-1, and the expression of IL-6, to reduce inflammation reactions.

心肌缺血再灌注 (ischemic reperfusion, I/R) 损伤是目前围手术期的最为常见的一种病理生理变化,它是冠脉溶栓术、经皮冠状动脉腔内成形术和冠状动脉旁路移植术等术后早期并发症的重要原因。因此,近年来探讨如何减轻或避免心肌缺血再灌注损伤已成为基础和临床研究的热点。其中有一类患者尤其受到临床医师的特别关注,即合并糖尿病的患者。糖尿病目前被公认为是心血管疾病的主要危险因素之一,许多流行病学和临床研究均表明,糖尿病患者中缺血性心脏病发病率是非糖尿病患者的 2 倍之多<sup>[1-2]</sup>。而且有些研究表明:相比非糖尿病患者,糖尿病患者对心肌缺血再灌注损伤具有更高的敏感性,更容易出现严重和致命的心肌梗死<sup>[3-5]</sup>。因此从糖尿病大鼠心肌缺血再灌注的模型入手,进一步探索合并糖尿病患者发生急性心肌梗死 (AMI) 后的干预措施成为当前急待解决的问题。

自从 2004 年美国学者 Roh 等<sup>[6]</sup>发现了 Intermedin (IMD),大量的研究已经表明 IMD 是较肾上腺素 (ADM) 作用更强、更广泛的超家族的新成员。由于 IMD 在结构和功能上与 ADM 有许多相似性,因此又被称为 ADM2。IMD 在人体分布较为广泛,在下丘

脑、肾脏和心脏均呈高表达<sup>[6-7]</sup>。心血管系统生理状态下,IMD 具有舒张血管、降低血压等生物学效应<sup>[7]</sup>,同时在心衰、心肌缺血再灌注损伤和高血压等情况下 IMD 均具有重要的生物学作用<sup>[8-9]</sup>。

但是由于糖尿病患者机体往往存在有心肌组织代谢紊乱,心肌肥大和纤维化,钙平衡调节异常等病理生理改变,从而改变了心肌对缺血再灌注损伤的反应性,导致某些对正常机体具有保护作用的措施在对糖尿病机体时出现作用减弱或消失的情况。因此 Intermedin 对糖尿病患者缺血再灌注心肌是否具有保护作用有待于探讨。

本实验通过观察 IMD 对糖尿病患者心肌缺血再灌注损伤炎症因子方面的影响,探讨其保护作用及其机制是否和炎症反应有关,从而为 IMD 在临床的广泛应用提供理论基础和实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠,220 ~ 250 g,购买于山西医科大学实验动物中心。室温控制在 18 ~ 20℃,湿度

60%~70%,自由进食饮水。所有实验动物均符合《实验动物中国医学科学院管理和使用指南》。

## 1.2 建立糖尿病大鼠模型

糖尿病动物模型采用化学诱导法建立<sup>[10]</sup>。将 74 只 SD 大鼠随机分为 2 组,分别为糖尿病组(DS)50 只和非糖尿病组(NS)24 只。适应性饲养一周后,所有大鼠禁食 12 h。然后糖尿病组给予腹腔注射 0.1 mmol/L 枸橼酸钠-枸橼酸缓冲液(pH=4.2)溶解的链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司)55 mg/kg 复制糖尿病大鼠模型,72 h 后剪尾尖采血测定血糖,以后每周采血监测血糖,若血糖持续 $\geq 16.7$  mmol/L 则视为糖尿病大鼠,表明造模成功。非糖尿病组只注射等量的枸橼酸缓冲液。所有大鼠适应性饲养三周后进行下一步试验。

## 1.3 建立心肌缺血再灌注模型

建模参照 Filippo 的方法<sup>[11-12]</sup>。首先以 1.5% 戊巴比妥钠将实验动物进行麻醉,以腹腔注射的方法按照 45 mg/kg 麻醉。之后仰卧位固定实验动物。然后将针式电极固定在大鼠四肢皮下以监测肢体导联心电图变化。随后进行气管插管,小心地剪开大鼠气管,连接小动物呼吸机,用手术线固定连接处,并调整小动物呼吸机设置为:EXP/INSP=1:2,呼吸频率 55 次/min,潮气量 14~16 mL。然后以剑突为体表标志,经胸骨左缘第 2~3 肋间用剪刀打开胸腔,暴露出心脏后,将心包膜剪开,于左心耳根部下方处进针,并通过左心耳和肺动脉圆锥交界处的右侧出针,使丝线两端均穿过一根的聚乙烯小管(长约 2 cm、直径 3 mm),拉紧丝线的两端后,应用小止血钳夹住聚乙烯小管;这样就达到了结扎冠状动脉前降支的目的,这时在监测的心电图上会发现 R 波明显增大并伴有 ST 段即刻抬高,几分钟后可见到结扎线以下的心肌组织颜色逐渐变暗,产生了心肌缺血;心肌缺血 30 min 后将止血钳松开,拔去聚乙烯小管,前降支血流即刻再通,实现了心肌的再灌注,这时应以心电图相关导联 ST 段明显回落为判断标准,持续再灌注 2 h 后,即成功复制了心肌缺血再灌注损伤模型。

## 1.4 实验分组

将 74 只 SD 大鼠随机分为两组:糖尿病组(D)50 只和非糖尿病组(N)24 只。非糖尿病大鼠随机分为对照组(NS)和缺血再灌注(NIR);50 只大鼠成功建立糖尿病模型 36 只,造模成功后,将其随机分为 3 组:即糖尿病对照组(DS)、糖尿病+缺血再灌注(DIR)、糖尿病+缺血再灌注+IMD 组(IMD),

且每组各 12 只。

实验分为以下 5 组:①对照组(NS 组):即只进行左冠状动脉的分离并穿线但不结扎,旷置 180 min;②缺血再灌注组(NIR 组):即结扎左冠状动脉 30 min 后,再灌注 2 h,并在缺血前 30 min 经股静脉给予生理盐水;③糖尿病对照组(DS 组):建立糖尿病模型后操作同①;④糖尿病缺血再灌注组(DIR 组):建立糖尿病模型后操作同②;⑤糖尿病缺血再灌注+IMD 组(IMD 组):建立糖尿病模型后操作同②,缺血前 30 min 经股静脉给予 IMD 0.1 nmol/kg<sup>[12]</sup>。

## 1.5 血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 含量的测定

心脏再灌注后,可由心尖部取血 2 mL,然后立即于低温 4℃,3 000 r/min 离心 15 min,取其上清液,并保存于-20℃冰箱。血清中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )和白细胞介素 6(IL-6)的含量采用 ELISA 法测定。按照检测试剂盒说明书操作具体步骤,应用酶标仪测定 OD450 的值。

## 1.6 实时荧光定量 PCR 法检测心肌组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和 IL-6 的 mRNA 的表达

按照提取 RNA 试剂盒说明书进行操作。当提取 RNA 结束后,要根据大概产量稀释 RNA 溶液到浓度范围,再通过紫外分光光度计测定 OD260。最后按照以下公式计算 RNA 浓度:RNA 浓度(mg/L)=OD<sub>260</sub>×40×稀释倍数/1000。

40 个循环后,72℃延伸 5 min。应用 SDS 软件分析处理数据。每个标本重复 3 次。荧光信号强度达到设置的阈值时所经历的循环数即为 Ct 值。mRNA 的相对表达量即为各组 PCR 产物与 GAPDH 的 Ct 值之差。结果按下列公式计算,mRNA 的相对表达量用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法来表示,实验组/对照组 =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - \Delta Ct_{\text{内参基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - \Delta Ct_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$ ,得到目的基因相对内参基因的量。因为考虑到结果是按指数级计算出来的,故对  $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$  进行统计分析。

## 1.7 免疫组织化学 S-P 法测定心肌组织中 NF- $\kappa$ B 的表达

剪取大鼠心脏心尖部组织,冰生理盐水进行冲洗后,将组织放入 4% 多聚甲醛过夜固定→0.1 MPBS 中孵育 30 min→70% 乙醇 1 h→80% 乙醇 1 h→90% 乙醇 1 h→95% 乙醇 1 h→100% 乙醇 1 h→100% 乙醇 1 h→二甲苯透明 30 min→二甲苯透明 30 min→放入热熔的石蜡中包埋

→待石蜡凝固,取出包埋块备用。SABC法进行免疫组化染色,然后应用HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统采集免疫组化结果图像,并进行统计分析。

1.8 Western blot 检测心肌组织 NF-κB 蛋白的表达

取心尖部心肌组织 200 mg 加入 2 mL PBS 液,然后将 1 mL RIPA 裂解液(含有 1% SDS,1% NP-40,50 mmol/L Tris-Cl, 10% 甘油,150 mmol/L NaCl, pH 7.5,1 mmol/L PMSF,1 mmol/L 钒酸钠)加入并在冰浴中进行匀浆,为充分裂解细胞,在冰上放置 20 min。离心 15 min(12000 转/分),取上清即为胞浆蛋白。取胞浆蛋白样品,加入电泳样品缓冲液,进行加热后,每泳道蛋白上样量为 20 μg,进行凝胶电泳。考马斯亮兰染色、脱色后,蛋白条带清晰可见。在转印槽中进行蛋白转印。用 TTBS 洗膜,用封闭液室温封闭 2 h。再加入一抗(稀释浓度 1:1000),4℃过夜。用 TTBS 洗膜 5 min×3 次。然后将稀释的链菌素抗生物素蛋白-辣根过氧化酶复

合物加入,37℃孵育 1 h。ECL 显色液显色 10~20 min,并通过凝胶成像系统扫描,以平均光密度 OD×面积表示蛋白含量。

1.9 统计学方法

每组实验均设三个重复,应用 SPSS17.0 统计软件对实验结果进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析各组均数之间的比较, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量

NIR 组和 DIR 组与各自对照组和 DS 组相比,大鼠血清中 TNF-α、IL-1β、和 IL-6 含量分别显著升高( $P < 0.05$ ),且糖尿病组上述指标分别明显高于非糖尿病组( $P < 0.05$ )。IMD 组与 DIR 组比较,大鼠血清中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量明显减少( $P < 0.05$ ;表 1)。

表 1. 各组 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量的比较

Table 1. Comparison of TNF-α, IL-1β and IL-6 in different groups

指 标	NS 组	NIR 组	DS 组	DIR 组	IMD 组
TNF-α (ng/L)	65.34 ± 1.49	111.7 ± 3.48	91.26 ± 2.36	197.9 ± 4.87 <sup>a</sup>	111.9 ± 8.85 <sup>b</sup>
IL-6 (ng/L)	152.2 ± 4.43	287.4 ± 12.44	183.0 ± 6.23	368.8 ± 12.92 <sup>a</sup>	266.8 ± 20.83 <sup>b</sup>
IL-1 (ng/L)	29.74 ± 1.62	70.09 ± 3.12	42.86 ± 2.02	97.23 ± 6.14 <sup>a</sup>	60.59 ± 3.87 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与 NS 组和 DS 组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 DIR 组比较。

2.2 心肌组织中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 的表达

各基因的熔解曲线呈单峰分布,提示引物特异性良好。各组心肌组织中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6mRNA 基因扩增曲线的 ΔCT 值及 RQ 值如下。实

表 2. 各组心肌组织中 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 mRNA 的表达

Table 2. mRNA expression of TNF-α, IL-1β and IL-6 in myocardium of different groups

指 标	NS 组	NIR 组	DS 组	DIR 组	IMD 组
TNF-α (ΔCt)	2.65 ± 0.14	4.35 ± 0.39	2.88 ± 0.22	5.22 ± 0.33 <sup>a</sup>	3.64 ± 0.49 <sup>b</sup>
IL-6 (ΔCt)	1.78 ± 0.81	4.08 ± 0.25	3.13 ± 0.10	4.47 ± 0.20 <sup>a</sup>	3.18 ± 0.28 <sup>b</sup>
IL-1 (ΔCt)	1.71 ± 0.17	3.71 ± 0.29	2.72 ± 0.26	5.25 ± 0.26 <sup>a</sup>	3.97 ± 0.41 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与 NS 组和 DS 组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与 DIR 组比较。

2.3 心肌组织中 NF-κB 表达的变化

免疫组织化学结果显示,NS 组和 DS 组大鼠心肌组织中 NF-κB 的阳性表达少且均在胞浆中出现;

缺血再灌注组(NIR 组和 DIR 组)中 NF-κB 表达多,阳性颗粒不仅出现在胞浆,而且胞核中也可见到阳性颗粒,即出现了核移位。IMD 组较 DIR 组 NF-κB



表达活性明显降低,特别在细胞核中阳性表达数明显减少,即缺血再灌注后限制了 NF-κB 从细胞浆向

细胞核的移位(图 1)。

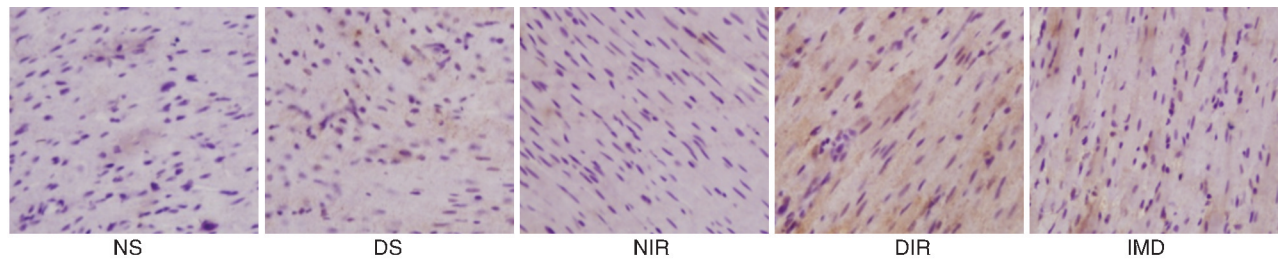


图 1. 各组心肌组织中 NF-κB 表达的变化(×400)  
Figure 1. The expression of NF-κB of each group in the myocardium by immunohistochemistry(×400)

2.4 Western blot 检测心肌组织 NF-κB 蛋白的表达  
与对照和糖尿病组相比,心肌缺血再灌注后的 NIR 组和 DIR 组 NF-κB 表达量均显著增加( $P < 0.05$ ),IMD 组的 NF-κB 蛋白的表达则明显低于 DIR 组( $P < 0.05$ ;图 2)。

在生理状态下,血管内皮粘附着大量的中性粒细胞,这样使得微循环障碍更易于发生,产生无复流现象。当缺血再灌注时,一方面激活血管内皮细胞,使其产生大量的 ROS,ROS 会使脂质过氧化;同时激活的粘附分子和释放的炎性因子等,使得中性粒细胞与之粘附并被激活,因此会释放弹力蛋白酶和胶原酶等破坏性蛋白酶和大量的毒性产物,从而导致血管通透性发生改变并损伤周围的组织细胞。由于缺氧及 ROS 的损伤最终会导致内皮细胞破坏、水肿并发生功能障碍,造成毛细血管阻塞,出现局部缺血区无复流现象。另一方面,再灌注期激活的血管内皮细胞分泌血管收缩物质增加,而分泌内皮源性舒张因子发生障碍,最终导致冠状动脉收缩、血小板聚集,从而加重心肌缺血和损伤。

目前研究发现相对于非糖尿病状态,糖尿病状态下炎性细胞的激活明显增多。全身或局部的炎性反应势必会使血管通透性增加,进而形成血栓以及血管收缩。另外有文献报道在应激性高血糖状态下,加剧的炎性反应产生大量炎性因子,这些炎性因子可以激活炎性应答分子,导致血液中肿瘤坏死因子、白细胞介素 1β 和白细胞介素 6 等炎性因子增加,从而加重心肌细胞损伤。本实验中 DS 组较 NS 组 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 均增高,说明血糖升高即可激活炎性细胞。

肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)主要由活化的单核/巨噬细胞产生,能杀伤和抑制肿瘤细胞的细胞因子。促进中性粒细胞吞噬,抗感染,引起发热,诱导肝细胞急性期蛋白合成,促进髓样白血病细胞向巨噬细胞分化,促进细胞增殖和分化,是重要的炎症介质,并参与某些自身免疫病的病理损伤。目前研究发现 TNF 有两种形式:TNF-α 与 TNF-β。TNF-α 主要由单核-巨噬细胞分泌,TNF-β 主要由活化的 T 淋巴细胞分泌,两者有相似致热

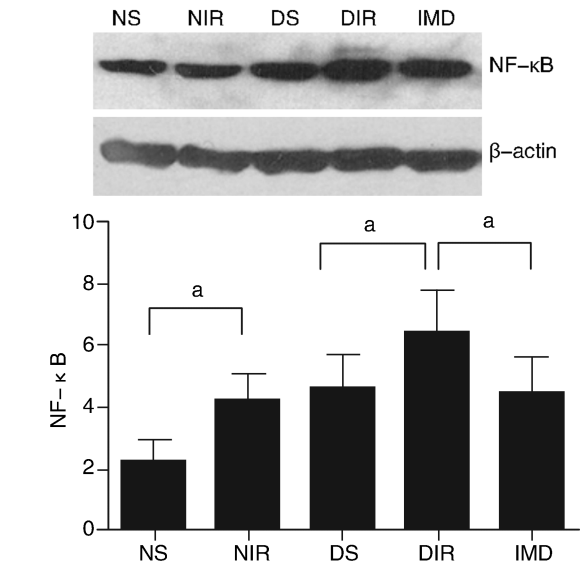


图 2. 各组心肌组织 NF-κB 蛋白的表达 a 为  $P < 0.05$ 。  
Figure 2. Western blot showed the expression of NF-κB among various groups

### 3 讨论

再灌注损伤是多种因素相互作用的结果。而由于损伤引起的炎性反应加剧是其中一种主要的病理生理途径。炎性细胞因子参与了心肌缺血再灌注损伤的发生和发展已被大量研究结果所证实<sup>[13]</sup>。并且也有许多的研究表明糖尿病可以明显增强缺血再灌注心肌的炎性反应<sup>[14]</sup>,糖尿病和各种炎性因子之间必然存在着联系。

性。由于 TNF- $\alpha$  与缺血再灌注损伤的相关性更为密切。因此,本研究中 TNF 指的是 TNF- $\alpha$ 。TNF- $\alpha$  不但本身具有心肌损伤的作用,而且它还可以诱导其他炎性介质的释放并增加 VCAM-1 的表达。白细胞介素 1(interleukin-1 IL-1)是由单核细胞、内皮细胞、成纤维细胞和其他类型细胞在应答感染时产生的细胞因子。有 IL-1 $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  两种类型,都与免疫球蛋白超家族的同一受体结合。白细胞介素 6(interleukin-6 IL-6)是活化的 T 细胞和成纤维细胞产生的淋巴因子。能促使 B 细胞前体成为产生抗体的细胞,同集落刺激因子协同作用时能增强体内自然杀伤细胞的裂解功能。

本研究结果显示心肌缺血再灌注后,NIR 组和 DIR 组大鼠血清及心肌 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 较对照组(NS 组和 DS 组)水平明显升高,说明缺血再灌注能过促使心肌生成炎性因子的重要刺激因素。并且 DIR 组与 NIR 组比较,各种炎性细胞因子升高的水平更加显著,表明糖尿病情况下确实加重了心肌缺血再灌注时的炎症反应,同文献报道结果是一致的<sup>[15-17]</sup>。IMD 组的大鼠血清及心组织中的炎性因子如:TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平较 DIR 组明显降低,表明 Intermedin 能够降低血清及心肌组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的水平,通过抑制糖尿病大鼠心肌缺血再灌注后的炎性反应,从而发挥对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。有研究表明大鼠缺血再灌注后血清中的炎性因子 IL-1 $\beta$  和 IL-6 显著升高,活化的单核巨噬细胞分泌 IL-1 $\beta$  和 IL-6,心肌自身也可在缺血缺氧的条件下自行分泌 IL-1 $\beta$  和 IL-6<sup>[18]</sup>。ICAM-1 和内皮-白细胞粘附分子 1(endothelial leucocyte adhesion molecule, ELAM-1)的表达可通过 IL-1 $\beta$  和 IL-6 直接上调。并且心肌由于各种炎性因子的刺激,在缺血再灌注后导致大量中性粒细胞聚集,这些炎性因子和中性粒细胞均会导致心肌直接受到损伤,使得心肌对缺血缺氧损伤的耐受性大幅度下降;另外心肌缺血再灌注后其微循环损伤也会加重,这又会扩展梗死区域,并出现无复流现象等。

NF- $\kappa$ B 是一个转录因子蛋白家族,包括 5 个亚单位:Rel (cRel)、p65 (RelA, NF- $\kappa$ B3)、RelB 和 p50 (NF- $\kappa$ B1)、p52 (NF- $\kappa$ B2)。机体对不同基因的表达所进行精细调节是通过不同的 NF- $\kappa$ B 二聚体的形式而进行的。最常见的 NF- $\kappa$ B 二聚体是 p65 与 p50 组成的异二聚体。游离的 NF- $\kappa$ B 能够迅速移位到细胞核,并与特异性  $\kappa$ B 序列结合,从而诱导相关基因转录。在哺乳动物细胞中广泛存的 NF- $\kappa$ B

是一个转录因子,它可以参与机体的许多生理病理过程,例如:免疫反应、炎性反应、细胞分化与凋亡及其他应激反应<sup>[19]</sup>。并且 NF- $\kappa$ B 也参与了心肌缺血再灌注损伤,并在这一病理生理过程中扮演者重要角色。研究表明机体的氧自由基、缺血、再灌注、白细胞介素等刺激因子一旦被激活,即可迅速经过细胞信号转导途径引起 NF- $\kappa$ B 活化,然后活化的 NF- $\kappa$ B 从胞质转移入细胞核,并与靶基因的  $\kappa$ B 位点结合从而促进炎性细胞因子增加<sup>[20-22]</sup>,最终导致炎性反应和细胞凋亡。同时也有研究显示,无论糖尿病病程的长短,NF- $\kappa$ B 在糖尿病患者机体内的多种组织均有异常表达<sup>[23]</sup>,说明糖尿病与 NF- $\kappa$ B 的异常表达必然具有某种联系。机体在高血糖状态下会增加反应性氧中间物(reactive oxygen intermediate,ROI)的表达、活化 NF- $\kappa$ B,使 NO 失活增强,并损伤心脏内皮细胞<sup>[24]</sup>。本研究结果发现糖尿病大鼠心肌组织在缺血再灌注后,NF- $\kappa$ B 明显从胞质移位到细胞核内,明显增加了细胞核 NF- $\kappa$ B 的表达,并同 western blot 结果相同,证实了心肌缺血再灌注过程中确实存在有炎性反应,并且在给予 intermedin 处理后,明显抑制了 NF- $\kappa$ B 的活化,降低了炎性细胞因子的表达,从而减轻心脏缺血再灌注的损伤。

本研究结果显示,intermedin 对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注具有保护作用,其部分保护作用机制可能与 intermedin 可以抑制 NF- $\kappa$ B 活化,从而减少炎性因子如:TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 的表达,减轻炎症反应有关。

#### [参考文献]

- [1] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2013, 127(1): 143-152.
- [2] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2010, 121(7): 948-954.
- [3] Woodfield SL, Lundergan CF, Reiner JS, et al. Angiographic findings and outcome in diabetic patients treated with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: the GUSTO-I experience[J]. J Am Coll Cardiol, 1996, 28(7): 1 661-669.
- [4] Hallbergson A, Gillespie MJ, Dori Y. A case of neonatal myocardial infarction: left coronary artery thrombus resolution and normalisation of ventricular function by intracoronary low-dose tissue plasminogen activator [J]. Cardiol

- Young, 2015, 25(4): 810-812.
- [5] Hong YJ, Jeong MH, Choi YH, et al. Impact of diabetes mellitus on plaque vulnerability and clinical outcome in patients with acute myocardial infarction with plaque rupture [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 154(2): 197-198.
- [6] Roh J, Chang CL, Bhalla A, et al. Intermedin is a calcitonin/calci-tonin gene-related peptide family peptide acting through the calci-tonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein re-ceptor complexes [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(8): 7 264-274.
- [7] Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, et al. Identification of novel ad-renomedullin in mammals; a potent cardiovascular and renal regulator [J]. *FEBS Lett*, 2004, 556(1/3): 53-58.
- [8] Yang JH, Qi YF, Jia YX, et al. Protective effects of intermedin/adrenomedullin2 on ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts [J]. *Peptides*, 2005, 26(3): 501-507.
- [9] Yang JH, Jia YX, Pan CS, et al. Effects of intermedin(1-53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 327(3): 713-719.
- [10] 孙敬方. 动物实验方法学 [M]. 北京人民卫生出版社, 2002, 477-481.
- [11] Di Filippo C, Rossi F, Rossi S, et al. Cannabinoid CB2 receptor activation reduces mouse myocardial ischemia-reperfusion injury; involvement of cytokine/chemokines and PMN [J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75(3): 453-459.
- [12] 陈君, 边云飞, 郝晓燕, 等. 不同浓度脂联素通过减轻氧化应激保护缺血再灌注心肌 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18(11): 857-859.
- [13] Turer AT, Hill JA. Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy [J]. *Am J Cardiol*, 2010, 106(3): 360-368.
- [14] Wang Y, Schmeichel AM, Iida H, et al. Enhanced inflammatory response via activation of NF-kappaB in acute experimental diabetic neuropathy subjected to ischemia-reperfusion injury [J]. *J Neurol Sci*, 2006, 247(1): 47-52.
- [15] Bertrand ME, Simoons ML, Fox KA, et al. Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation [J]. *Eur Heart J*, 2002, 23(23): 1 809-840.
- [16] Chaudhuri A, Janicke D, Wilson MF, et al. Anti-inflammatory and profibrinolytic effect of insulin in acute ST-segment-elevation myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2004, 109(7): 849-854.
- [17] Marfella R, Siniscalchi M, Esposito K, et al. Effects of stress hyperglycemia on acute myocardial infarction: role of inflammatory immune process in functional cardiac outcome [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(11): 3 129-135.
- [18] Kaczorowski DJ, Nakao A, Vallabhaneni R, et al. Mechanisms of Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated inflammation after cold ischemia/reperfusion in the heart. Transplantation [J]. 2009, 87(10): 1 455-163.
- [19] Squadrito F, Deodato B, Squadrito G. Gene transfer of IkappaBalpha limits infarct size in a mouse model of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Lab Invest*, 2003, 83(8): 1 097-104.
- [20] Schimamoto A, Chong SJ, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2006, 114(1 Suppl): 1 270-274.
- [21] Malik S, Sharma AK, Bharti S, et al. In vivo cardioprotection by pitavastatin from ischemic-reperfusion injury through suppression of IKK/NF-kB and upregulation of pAkt-e-NOS [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2011, 58(2): 199-206.
- [22] Hu ZC, Chen YD, Ren YH. Methylprednisolone improves microcirculation in streptozotocin-induced diabetic rats after myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Chin Med J (Engl)*. 2011, 124(6): 923-929.
- [23] Pai S, Thomas R. Immune deficiency or hyperactivity-Nf-kappaB illuminates autoimmunity [J]. *J Autoimmun*, 2008, 31(3): 245-251.
- [24] Stockklauser-Farber K, Ballhausen T, Laufer A, et al. Influence of diabetes on cardiac nitric oxide synthase expression and activity [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1 535(1): 10-20.
- (此文编辑 李小玲)