

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0662-03

肿瘤坏死因子 α 介导大鼠心肌梗死后 心功能变化的机制

谢萍¹, 徐义先¹, 祝善俊², 杨铮¹, 高志凌¹

(1. 甘肃省人民医院心内科, 甘肃省兰州市 730000; 2. 第三军医大学新桥医院心内科, 重庆市 400037)

[关键词] 实验动物学; 肿瘤坏死因子 α ; 电泳动度迁徙率法; 核因子 κ B; 基质金属蛋白酶; 心肌胶原含量; 心功能

[摘要] 为探讨大鼠心肌梗死后衰竭心肌肿瘤坏死因子 α 表达、基质金属蛋白酶活性和核因子 κ B活化与心肌胶原含量、心功能的相互关系, 通过结扎大鼠冠状动脉前降支复制心肌梗死模型, 同时设假手术组, 分别在4周、8周和12周后检测血流动力学和心功能指标。同时检测左心室非梗死区心肌肿瘤坏死因子 α 蛋白水平、核因子 κ B活性、明胶分解活性和心肌胶原容积指数。结果发现, 心肌梗死后心肌肿瘤坏死因子 α 表达显著增加, 呈时间依赖性, 与心功能呈负相关; 心肌梗死后4周、8周和12周时心肌核因子 κ B活性、基质金属蛋白酶2和9活性以及胶原容积指数均呈进行性增加, 而心功能逐渐恶化。以上说明, 衰竭心肌核因子 κ B持续活化、肿瘤坏死因子 α 过度表达和明胶分解活性增强可能是导致心肌梗死后心室重塑和心力衰竭的重要机制之一。

[中图分类号] R

[文献标识码] A

Mechanisms of Heart Function Change Mediated by Tumor Necrosis Factor- α in the Postmyocardial Infarction Rats

XIE Ping, XU Yi Xian, ZHU Shan Jun^④, YANG Zheng, and GAO Zhi Ling(Department of Cardiology, Gansu Provincial People's Hospital, Lanzhou 730000; ^④Department of Cardiology, Xinqiao Hospital Affiliated to the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Tumor Necrosis Factor α ; Nuclear Factor κ B; Matrix Metalloproteinases; Contraction of Myocardial Collagen; Heart Function; Myocardial Infarction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship of tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinases (MMPs) and NF- κ B on postmyocardial infarction progressive heart failure in rats. **Methods** Male rats were randomised to proximal left anterior descending branch coronary artery ligation. The rats were killed on weeks 4, 8, and 12 after ligation to examine hemodynamic parameters. Protein expression of TNF- α , MMPs gelatinolytic activity and NF- κ B activity was assessed from noninfarcted myocardium, sham-operated rats were used as the control group. **Results** Compared with sham-operated group, the myocardial infarction rats showed significant decrease in mean arterial pressure (MAP), maximal ascending and descending velocity of the left ventricular pressure ($\pm dp/d_{max}$) and significant increase in left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) (all $P < 0.05$). In comparison with sham-operated group, TNF- α production was increased significantly, MMP-2 and MMP-9 zymographic activity, NF- κ B activity, and collagen volume fraction (CVF) increased significantly at weeks 4, 8 and 12 after ligation in noninfarcted myocardium. **Conclusions** TNF- α overexpression is related to increase in MMP gelatinolytic activity and NF- κ B activity, which suggests that TNF- α can play an important role in postinfarction ventricular remodeling and progressive heart failure.

肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是参与心室重塑和心力衰竭进展最为密切的细胞因子之一, 可作为临床判断心力衰竭疾病程度和预后的指标。近年研究表明, 心肌细胞、内皮细胞以及平滑肌细胞中存在与炎症反应有关的核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 激活通路^[1], 可以调控包括

TNF- α 在内的细胞因子的基因转录。同时离体实验证实, 细胞因子是基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 基因表达和活化的重要调节者^[2]。因此我们推测, NF- κ B 的异常激活可能是心室重塑和心力衰竭发生与发展的机制之一。本研究通过探讨心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 后心力衰竭大鼠心肌 TNF- α 表达、NF- κ B 活化及其 MMP 明胶分解活性的变化规律, 旨在阐明 TNF- α 在心室重塑和心力衰竭中的作用机制。

[收稿日期] 2004-06-09 [修回日期] 2004-09-30

[作者简介] 谢萍, 医学博士, 副主任医师, 主要从事心力衰竭发生机制的研究, 联系电话为 0931-8281783, E-mail 为 pingxic66@163.com。徐义先, 副主任医师, 主要从事冠心病发生机制的研究, 联系电话为 0931-8281921。祝善俊, 学士, 教授, 主任医师, 主要从事心力衰竭发生机制的研究, 联系电话为 023-8281783, 系实验指导者。

1 材料与方法

1.1 动物模型的复制与分组

取体重 220 ± 20 g 的 Wistar 雄性大鼠(第三军医大学动物中心提供),在乙醚麻醉、人工呼吸及心电图监护下,于左侧第四肋间开胸暴露心脏,用 7-0 丝线结扎左前降支,制成心肌梗死模型。大鼠清醒后称重,随机分为: MI_{4w} 组($n=10$), MI_{8w} 组($n=8$), MI_{12w} 组($n=7$)。假手术组(SH 组)行同样的手术过程,但不结扎冠状动脉,随机分为: SH_{4w} 组($n=8$), SH_{8w} 组($n=7$)和 SH_{12w} 组($n=8$)。

1.2 血流动力学参数测定及组织标本留取

导管法行血流动力学检测,多导生理记录仪分别记录平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)、左心室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)和室内压最大上升和下降速率(maximal ascending and descending velocity of the left ventricular pressure, $\pm dp/dt_{max}$)。自左心室非梗死区心肌组织切取厚度约 5 mm 组织,置中性甲醛中固定,其余组织液氮保存。

1.3 Western blot 法检测肿瘤坏死因子 α 蛋白表达

将 40 μ g 蛋白凝胶电泳分离后,电转法转移至 PVDF 膜,37 $^{\circ}$ C 下 5% 脱脂奶溶液封闭 3 h,然后与 1:1 000 iv 抗溶液反应(羊抗鼠 TNF- α 多克隆抗体) 4 h,0.1% Tween-20 磷酸缓冲液漂洗后,再与 1:2 000 辣根过氧化物酶标记的 α 抗(兔抗羊 IgG) 孵育 2 h,洗膜后与 NEN 化学发光试剂(NEC 公司)反应 1~3 min,使 X 光片曝光,常规方法显影、定影;光密度扫描半定量分析显影带。

1.4 明胶酶谱法测定基质金属蛋白酶活性

按 Tyagi 等^[3]方法进行心肌组织蛋白抽提,将组织抽提液(含 30 μ g 蛋白)经含 1 g/L 明胶的凝胶电泳分离,37 $^{\circ}$ C 消化缓冲液中孵育 4 h,0.25% 考马斯亮蓝 R-250 染色过夜,然后脱色至透明带显现出来。扫入凝胶成像系统进行图像分析,计算光密度值(OD 值)。

1.5 心肌核因子 κ B 活性的检测

按 Roche 公司提供的地高辛标记凝胶迁徙试剂盒说明书进行。NF- κ B 同序寡核苷酸探针序列为 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG G-3'; 3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'。将 10 μ g 核蛋白与 2 μ L DIG-标记寡核苷酸结合反应,在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转法转移至尼龙膜,再与 1:10 000 抗体(Ant-Digoxigenin AP)溶液孵育 30 min,然后 CSPD 化学发光反应 10 min,X 线光片曝光 30~60 min,常规方法显影、定影。

1.6 心肌胶原染色与图像处理

固定后的组织经石蜡切片,天青蓝液染 10 min,天狼猩红饱和苦味酸液染 30 min,无水乙醇直接分化与脱水。偏振光下观察,iv 型胶原纤维呈红色或黄色,III 型胶原纤维呈绿色。用图像分析仪行图像处理,计算每个视野中胶原组织所占百分比,最后取均数代表胶原容积指数(CVF,%)。

1.7 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析、 t 检验及相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性。

2 结果

2.1 各组血流动力学参数的改变

与同期 SH 组比较,MI 组 LVEDP 明显增高,并呈时间依赖性;MAP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 显著下降($P < 0.01$),呈进行性下降趋势(表 1, Table 1)。

表 1. 心肌梗死后大鼠血流动力学参数和心功能指标的改变($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Hemodynamic changes following myocardial infarction in rats

分 组	<i>n</i>	MAP (mm Hg)	LVEDP (mm Hg)	+ dp/dt _{max} (mm Hg/s)	- dp/dt _{max} (mm Hg/s)
SH _{4w}	8	115 \pm 10	3.91 \pm 0.82	5 845 \pm 415	4 269 \pm 470
SH _{8w}	7	107 \pm 11	4.85 \pm 1.12	5 964 \pm 395	4 351 \pm 485
SH _{12w}	8	105 \pm 9	4.1 \pm 1.78	6 066 \pm 436	4 301 \pm 309
MI _{4w}	10	99 \pm 9 ^a	9.01 \pm 3.37 ^a	4 709 \pm 269 ^b	3 639 \pm 329 ^a
MI _{8w}	8	87 \pm 12 ^b	16.86 \pm 3.06 ^b	4 312 \pm 266 ^b	3 219 \pm 320 ^b
MI _{12w}	7	88 \pm 13 ^b	21.63 \pm 3.71 ^b	4 109 \pm 270 ^b	3 236 \pm 299 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与同期 SH 组比较。1 mm Hg = 0.133 kPa。

2.2 各组心肌组织的胶原含量与核因子 κ B 活性的变化

与 SH 组相比,4 周、8 周和 12 周时 MI 组的非梗死区心肌胶原容积指数(%) 明显增加(2.85 \pm 0.27 比 9.15 \pm 0.64, 3.09 \pm 0.22 比 13.68 \pm 0.73, 3.14 \pm 0.26 比 14.74 \pm 0.91, $P < 0.01$)。偏振光胶原定性分析结果显示,以 iv 型胶原增加为主。MI 组心肌 NF- κ B 活性均较 SH 组明显增加,4 周、8 周和 12 周不同时相点分别增加 1.94、2.81 和 3.45 倍($P < 0.01$)。

2.3 心肌肿瘤坏死因子 α 的蛋白表达与心功能的关系

与同期 SH 组相比,MI 组心肌 TNF- α 蛋白表达均明显增加,4 周、8 周和 12 周不同时相点分别增加

1.65、2.74 和 3.1 倍 ($P < 0.01$), 呈进行性增加。将心肌组织 TNF- α 蛋白表达与 + dp/dt_{max} 和 - dp/dt_{max} 进行相关分析, 结果表明, 心肌组织 TNF- α 蛋白表达与 + dp/dt_{max} ($r = -0.59$) 和 - dp/dt_{max} ($r = -0.65$) 均呈负相关。

2.4 心肌组织明胶分解活性的变化

心肌组织抽提液经 Gelatin-PAGE 电泳后, 在蛋白分子标准约 92 kDa、88 kDa 和 68 kDa 处出现白色降解条带, 分别为前体型、活化型 MMP-9 和活化型 MMP-2。MI 组与同期 SH 组相比, MMP 明胶分解活性显著增强, 在 4 周、8 周和 12 周时 MMP-2 活性分别增强 2.96、4.04 和 5.68 倍 ($P < 0.01$), MMP-9 活性分别增强 2.35、2.89 和 3.64 倍 ($P < 0.01$), 其中 MMP-2 活性增强最为显著 (图 1, Figure 1)。

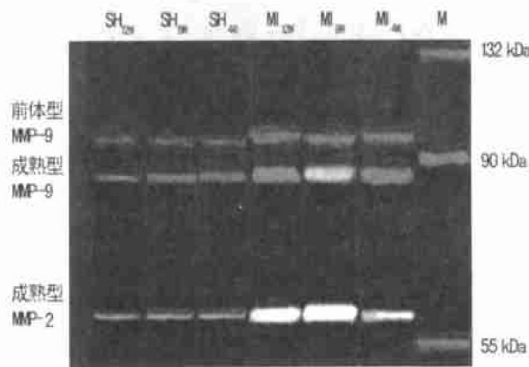


图 1. 心肌组织基质金属蛋白酶明胶分解活性的变化

Figure 1. Changes in myocardial MMP gelatinolytic activity following myocardial infarction

3 讨论

心肌梗死后组织缺氧、室壁张力增加及神经内分泌异常均可促使心脏合成和分泌 TNF- α 增多, TNF- α 以自分泌或旁分泌形式对局部心血管组织产生负面生物学效应。一方面, 通过诱导 MMP 表达和活化, 使维持正常心肌细胞排列的胶原网降解, 最终导致心室腔扩大; 另一方面, TNF- α 的细胞毒效应引起细胞凋亡和坏死, 心肌细胞丢失, 被非心肌细胞取代, 纤维结缔组织增生, 导致心肌僵硬增加, 顺应性下降; 如此构成心室重塑的特征性改变和心功能不全不断加重^[1,4]。本实验资料显示, 心肌梗死后 4 周、8 周和 12 周时大鼠心肌组织的 TNF- α 蛋白水平均明显增高, TNF- α 表达水平与 + dp/dt_{max} 和 - dp/dt_{max} 均呈负相关, 随心功能的恶化, 其表达量增高; 提示炎性细胞因子 TNF- α 与心力衰竭的发生发展密

切相关。

离体实验证实, 炎性细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 均可诱导心肌成纤维细胞 MMP 蛋白表达上调及活化^[5]。其中 TNF- α 主要是通过激活细胞表面受体, 使 NF- κ B 活化发生核移位, 从而诱导 MMP 表达和活化。本文结果表明, 心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌 TNF- α 表达、NF- κ B 活性和 MMP 明胶分解活性均明显增高, 且与胶原含量增加和心功能降低相一致。提示心肌组织 TNF- α 表达与 NF- κ B 活化、MMP 活性增强密切相关。因此, 我们认为, 心肌局部 TNF- α 产生增多和 NF- κ B 持续激活, 导致心肌局部 MMP 持续产生和活化, 促进胶原降解增加和胶原纤维网破坏, 最终引起胶原沉积, 这是构成心肌梗死后心肌间质重塑和心力衰竭进行性发生发展的主要机制之一。

近年研究认为炎性反应参与心力衰竭的发展过程, 因此推测 NF- κ B 可能在心力衰竭病理过程中起重要作用。本实验研究心肌梗死后非梗死区心肌 NF- κ B 活化与 TNF- α 表达的关系, 获得了支持 NF- κ B 通路参与心肌梗死后心室重塑和心力衰竭进展的实验依据。此外, 尽管 NF- κ B 能在转录水平激活各种炎性细胞因子, 而某些细胞因子如 TNF- α 又可进一步激活 NF- κ B, 如此循环, 产生级联放大作用, 从而间接诱导 MMP 的表达和活化, 同时, NF- κ B 还可以直接激活 MMP 基因, 参与促进胶原纤维降解, 这一作用对细胞外基质重塑至关重要^[6,7]。

总之, 本研究表明心肌梗死后衰竭心肌 NF- κ B 持续激活可能是 TNF- α 和 MMP 介导心肌间质重塑和心力衰竭的机制之一。

[参考文献]

- [1] Deswal A, Petersen NJ, Feldman AM, Young JB, White BG, Mann DL. Cytokines and cytokine receptors in advanced heart failure: an analysis of the cytokine database from the Vesnarinone Trial (VEST). *Circulation*, 2001, **103**: 2 055-059
- [2] Valen G, Yan ZQ, Hanson GK. Nuclear factor kappa B and the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, **38**: 307-314
- [3] Tyagi SC, Matsubara L, Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem*, 1993, **26**: 191-198
- [4] Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling: concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 2000, **35**: 569-582
- [5] Saren P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol*, 1996, **157**: 4 159-165
- [6] Spinale FG. Matrix metalloproteinases regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res*, 2002, **90**: 520-530
- [7] 纪求尚, 张运, 杨晓静, 马冬冬, 朱媛媛. 急性心肌梗死患者炎症介质的动态变化及意义. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 349-351 (此文编辑 朱雯霞)