

· 基础研究 ·

核因子- κ B 在慢性间歇性低氧对大鼠左心功能影响中的作用

罗 勤, 赵智慧, 柳志红*, 张洪亮

(中国医学科学院阜外心血管病医院肺血管病诊治中心, 北京 100037)

【摘要】目的 了解慢性间歇性低氧对大鼠左心功能的影响, 探讨 NF- κ B 在其发生机制中的作用。**方法** 将 24 只 SD 大鼠随机分为 3 组: 正常对照组 (NC), 慢性间歇性低氧组 (CIH), CIH + PDTC (吡咯烷二硫代氨基甲酸盐, NF- κ B 抑制剂) 组。CIH 组每天白天置于间歇性低氧箱 (最低氧浓度 5%~7%) 8 h, 共 5 周; CIH + PDTC 组每天腹腔注射 PDTC 100mg/kg, 饲养环境与 CIH 组相同; 正常对照组给予相似的处理, 但是维持空气氧浓度不变。测量大鼠体重、血压、心率, 超声心动图评价心功能; 最后提取大鼠心肌组织核蛋白, Western blot 法测量 NF- κ B 蛋白水平的表达。**结果** 第 5 周时 CIH 组和 CIH + PDTC 组体重低于 NC 组。CIH 组和 CIH + PDTC 组血压明显高于 NC 组 [分别为 (136.3 ± 6.8) (134.3 ± 6.7) 和 (122.3 ± 4.1) mmHg, $P < 0.01$], CIH 组和 CIH + PDTC 组两组间差异无统计学意义。CIH 组 LVEF 低于 NC 组 [分别为 (73 ± 6) % 和 (86 ± 4) %, $P < 0.001$], CIH + PDTC 组 [(84 ± 4) %] 较 CIH 组明显升高 ($P < 0.001$), 与 NC 组比较没有明显差异 ($P = 0.117$)。各组心率无明显统计学差异。NF- κ B 蛋白水平的表达 CIH 组高于 NC 组和 CIH + PDTC 组, NC 组与 CIH + PDTC 组间没有统计学差异。**结论** 慢性间歇性低氧大鼠左心功能减低, NF- κ B 可能参与其作用机制。

【关键词】 慢性间歇性低氧; 心室功能障碍; 左; 核因子- κ B; 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐

【中图分类号】 R541.6

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2011.00040

Role of NF- κ B in cardiac dysfunction due to chronic intermittent hypoxia in rats

LUO Qin, ZHAO Zhihui, LIU Zhihong, ZHANG Hongliang

(Center for Pulmonary Vascular Diseases, Fuwai Hospital & Cardiovascular Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, China)

【Abstract】 Objective To investigate the impact of chronic intermittent hypoxia (CIH) on cardiac function, and explore the role of NF- κ B in the mechanisms of cardiac dysfunction due to CIH. **Methods** Twenty-four adult male Sprague-Dawley rats (body mass about 200g) were randomly divided into three groups: normal control (NC) group, CIH group and CIH + proline dithiocarbamate (PDTC) group. The rats in CIH group were exposed to intermittent hypoxia (O_2 5%~7%), 8 hours daily, totally 5 weeks. The rats in CIH + PDTC group were raised under the condition similar to CIH group except intraperitoneal injection of PDTC [100mg/(kg·d)]. At the end of the exposure, body mass, blood pressure and heart rate of the animals were measured. Left global function was assessed by echocardiography. Nucleoprotein NF- κ B level was detected by Western blot. **Results** At 5 weeks, the body mass of rats in CIH and CIH + PDTC groups was lower than that in NC group. Compared to NC group, animals in CIH and CIH + PDTC groups demonstrated an elevation in blood pressure [(136.3 ± 6.8) and (134.3 ± 6.7) vs (122.3 ± 4.1) mmHg, $P < 0.001$]; while the blood pressure was not significantly different between CIH and CIH + PDTC groups. Left ventricular ejection fraction (LVEF) was lower in CIH group than in NC group [(73.0 ± 5.6) % vs (86.0 ± 4.3) %, $P < 0.001$], and higher in CIH + PDTC group than in CIH group [(84.0 ± 4.1) % vs (73.0 ± 5.6) %, $P < 0.001$]. However, it was not significantly different between NC and CIH + PDTC groups ($P = 0.117$). There was no significant difference in heart rate among the groups. Compared to NC and CIH + PDTC groups, the expression of NF- κ B increased in CIH group ($P < 0.001$). However, there was no difference between NC and CIH + PDTC groups. **Conclusion** Chronic intermittent hypoxia may impair left ventricular function of rats and NF- κ B may be involved in the mechanisms.

【Key words】 chronic intermittent hypoxia; left ventricular dysfunction; NF- κ B; PDTC.

This work was supported by Public Service Fund for Scientific Research Institutes (2007F010)

睡眠呼吸暂停是指夜间睡眠中反复的呼吸停止或低通气, 造成反复低氧和 (或) 觉醒, 引起一系列病理生理改变。研究显示睡眠呼吸暂停患者心力衰

竭的风险增加, 充血性心力衰竭患者合并睡眠呼吸暂停的发生率高达 71%~82%^[1,2]。对睡眠呼吸暂停的临床及基础研究显示, 夜间反复的低氧-复氧可导

收稿日期: 2010-12-31; 修回日期: 2011-05-05

基金项目: 中央级公益性科研院所基金 (2007F010)

通讯作者: 柳志红, Tel: 010-88396590, E-mail: liuzhihong_fw@263.net

致交感神经驱动增加、氧化应激和炎症反应^[3], 认为这些因素可能参与了睡眠呼吸暂停综合征患者的心血管损害, 但关于睡眠呼吸暂停患者心功能异常的确切机制尚不明确。近年, 大量证据显示核因子 NF- κ B 信号转导途径所介导的炎症反应及细胞凋亡在心肌重塑中发挥重要作用, 参与心力衰竭的发生发展。因此, 本研究旨在探讨核因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)信号转导在慢性间歇性低氧大鼠心功能改变中的作用, 初步了解睡眠呼吸暂停对心功能影响的发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 24 只, 体重 200g 左右, 由阜外心血管病医院实验动物中心提供。随机分为 3 组: 正常对照组 (NC 组)、慢性间歇性低氧组 (CIH 组) 和 NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫代氨基酸甲酸盐 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 干预组, 每组 8 只。CIH 组: 大鼠放于有机玻璃容器内, 间歇性低氧饲养, 最低氧浓度 5%~7%, 每分钟循环一次, 每天 8h (9:00am~5:00pm), 持续 5 周; NC 组: 大鼠放于与 CIH 组相同的容器中, 正常空气饲养; CIH + PDTC 组: 大鼠放于与 CIH 相同的容器中, 间歇性低氧饲养 (同 CIH 组), 每日给予 PDTC 100 mg/kg 腹腔内注射。PDTC 购自美国 Sigma 公司; 核蛋白提取缓冲液购自普利莱公司; 蛋白浓度测定标准品购自普利莱公司; 小鼠抗 NF- κ Bp65 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗小鼠辣根酶标二抗购自美国 Sigma 公司; AlphaImager HP 凝胶成像仪 (Alpha Innotech, 美国) 采集图像, AlphaImager 3400 凝胶成像分析系统 (Alpha Innotech, 美国) 进行分析。

1.2 血压、心率和体重的测量

每周采用电子秤称量各组大鼠体重。饲养结束时采用 RBP-1B 型大鼠血压计 (中日友好临床医学研究所生产), 通过鼠尾测量法测定大鼠血压、心率。

1.3 心脏超声多普勒测定心功能

腹腔注射 10% 水合氯醛 (300 μ l/kg), 观察大鼠反应; 采用 philips SONOS 7500 型超声仪, 由对小动物检测经验丰富的医师进行操作; 测量的指标包括左心室舒张末期内径 (left ventricular end diastolic dimension, LVEDD)、左心室收缩末期内径 (left ventricular end systolic dimension, LVESD)、左心室短

轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS) 和左心室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)。

1.4 大鼠心脏质量测定

将大鼠处死后, 分离心脏, 称重, 然后剥离右心室组织, 量取左心室质量。

1.5 Western blot 法检测心肌组织 NF- κ B 含量

取大鼠左心室心肌组织 500mg, 按照核蛋白提取试剂盒说明书提取心肌组织核蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, Western blot 法检测心肌组织 NF- κ B 表达水平。稀释一抗: 小鼠抗 NF- κ B p65 单克隆抗体, 浓度为 1:500; 稀释二抗: 兔抗小鼠辣根酶标二抗 (Sigma, 美国), 浓度 1:10 000; 发光、曝光及分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 进行数据资料分析。连续变量以均数 \pm 标准差表示。分类变量以百分率或构成比表示。两组间均数比较采用 Independent Samples Student's *t*-test, 多组均数比较为 ANOVA 分析, 组间比较用 Bonferroni 方法校正, 率的比较用卡方检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 慢性间歇性低氧对大鼠体重的影响

图 1 所示为各组大鼠实验期间体重的变化。基线时各组大鼠体重无明显差别, 第 5 周实验结束时 NC 组体重明显高于 CIH 组及 CIH + PDTC 组 ($P < 0.05$)。

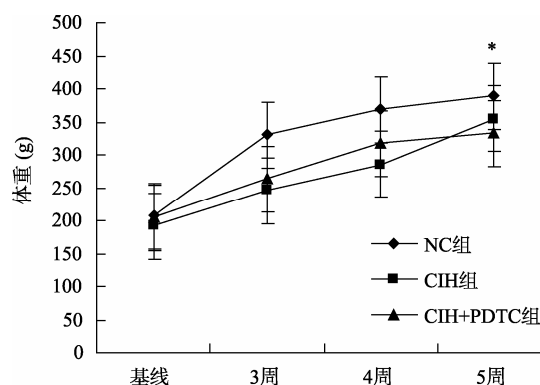


图 1 3 组大鼠基线至 5 周时的体重变化与 CIH 组及 CIH + PDTC 组比较, $*P < 0.05$

2.2 慢性间歇性低氧对大鼠心脏质量及血压、心率和心功能的影响

表 1 概括了第 5 周实验结束时左心室质量占体

重的比值和无创检查测量血压、心率和左心室功能指标的数据。CIH 组和 CIH + PDTC 组血压明显高于 NC 组 ($P < 0.05$), CIH 组和 CIH + PDTC 组两组间差异无统计学意义。CIH 组 LVEF 和 LVFS 均低于 NC 组, CIH + PDTC 组较 CIH 组明显升高, 与 HC 组比较两组间没有明显差异。各组心率无明显统计学差异。

表 1 各组大鼠 5 周时无创检查血流动力学参数 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

观测指标	NC	CIH	CIH + PDTC
LV/BM ($\times 10^3$)	2.53 ± 0.16	$3.04 \pm 0.24^*$	$2.82 \pm 0.21^{*#}$
BP(mmHg)	122 ± 4	$136 \pm 7^*$	$134 \pm 7^*$
HR(次/min)	382 ± 45	380 ± 40	363 ± 27
LVEDD(mm)	7.3 ± 0.6	6.7 ± 0.6	7.2 ± 1.0
LVESD (mm)	3.6 ± 0.5	4.2 ± 0.5	3.7 ± 0.8
LVFS (%)	51 ± 5	$38 \pm 4^*$	$49 \pm 5^*$
LVEF(%)	86 ± 4	$73 \pm 6^*$	$84 \pm 4^*$

注: BM: 体重; LV: 左室质量; BP, 血压; HR: 心率; LVESD: 左心室收缩末期腔径; LVFS: 左心室短轴缩短率; LVEF: 左心室射血分数。1 mmHg=0.133kPa。与 NC 组比较, $^*P < 0.001$; 与 CIH 组比较, $^*P < 0.001$

2.3 各组心肌组织核蛋白 NF- κ B 的表达比较

图 2 和图 3 所示为 3 组 NF- κ B 表达水平。与 NC 组比较, CIH 组 NF- κ B 表达增加 ($P < 0.01$), 而 CIH + PDTC 组与 NC 组无明显差异; CIH 组 NF- κ B 表达明显高于 CIH + PDTC 组 ($P < 0.01$)。

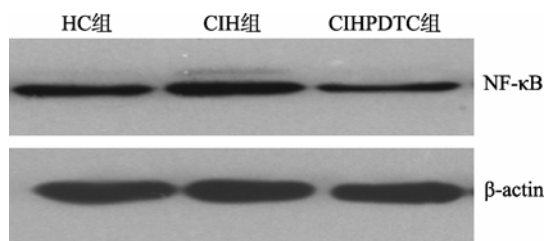


图 2 各组心肌组织核蛋白 NF- κ B 的表达

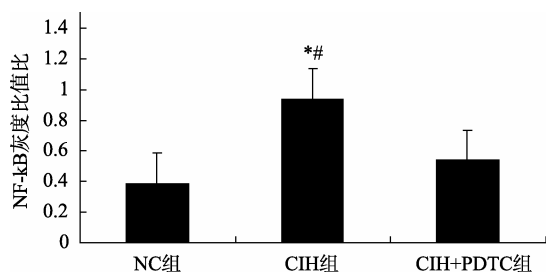


图 3 各组间 NF- κ B 灰度比值比较

NC 组: 正常对照组; CIH 组: 间歇性低氧组; CIH + PDTC 组: PDTC 干预组。与 NC 组比较, $^*P < 0.01$; 与 CIH + PDTC 组比较, $^*P < 0.01$

3 讨论

本研究中慢性间歇性低氧 5 周后发现, CIH 组

血压明显高于 NC 组, 左心室收缩和舒张功能明显低于 NC 组。Chen 等^[4]将大鼠暴露于慢性间歇性低氧 (最低氧浓度 4%~5%) 每天 8h, 每周 5 天, 共 5 周, 鼠尾测压法测定血压和心率。结果显示, 与对照组相比, 第 2 周时 CIH 组血压高于 NC 组[分别为 (132 ± 12) 和 (128 ± 8) mmHg; $P < 0.05$], 但在第 5 周实验结束时这种动脉收缩压的差别消失[(127 ± 13) 和 (127 ± 13) mmHg; $P > 0.05$]. 各时间点两组大鼠心率没有明显差别。超声心动图的数据显示, CIH 组左心室容积明显较 NC 组增大, LVFS 和 LVEF 降低。在进一步的实验中^[5], 第 6 周时对 CIH 组和 NC 组大鼠进行心导管检查, 结果显示与 NC 组相比, CIH 组左心室舒张末期压明显升高, 心输出量和 dp/dt_{max} 明显降低, 并且 CIH 组心肌细胞凋亡增加, caspase-3 表达增加, 一些心室重构的基因标记物包括 β 肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链-2 等表达增加, 考虑间歇性低氧可以引起左心功能不全, 与心肌细胞肥厚和心肌细胞凋亡相关。国内杨博等^[6]在全身麻醉下利用气管套管钳夹犬气管, 造成人为的反复气道阻塞 3 个月, 模拟睡眠呼吸暂停, 超声心动图检查发现 LVEF 明显下降, 也显示间歇性低氧可引起左心功能降低。

NF- κ B 是一种几乎存在于所有细胞的转录因子。广泛参与调节各种涉及细胞进程包括炎症、细胞黏附和迁移、凋亡、肥厚等基因的表达^[7]。近年的实验结果表明, 诱导心肌细胞凋亡的过程中伴有 NF- κ B 活化^[8], 介导心肌细胞凋亡信号通路, 参与了心力衰竭的发生发展。

早期 Ryan 等^[9]报道间歇性低氧能刺激 HeLa 细胞中 NF- κ B 转录活性, 接着对睡眠呼吸暂停患者单核细胞 NF- κ B 活性进行分析, 发现 19 例睡眠呼吸暂停患者 NF- κ B 的 DNA 结合活性明显高于正常对照组。Htoo 等^[10]对 22 例患者进行睡眠呼吸监测, 并按呼吸暂停低通气指数为 5/h、11~40/h 和 $> 40/h$ 分为对照组、轻中度和重度 3 组, 采集清晨外周静脉血, 分离中性粒细胞, 用电泳迁移率方法分析 NF- κ B 结合活性, 结果发现轻中度和重度患者 NF- κ B 结合活性分别是对照组的 4.8 倍和 7.9 倍, NF- κ B 活性程度与呼吸暂停低通气指数呈正相关, 5 例重度患者经过 1 个月的无创呼吸机正压通气治疗后 NF- κ B 活性降低约 56%, 至对照组水平。Greenberg 等^[11]也证实慢性间歇性低氧能激活大鼠心肌组织和动脉 NF- κ B 的 DNA 结合活性。本组研究数据也显示, CIH 组心肌核蛋白 NF- κ B 水平明显

高于 NC 组,但是其具体机制尚不明确。CIH 激活 NF- κ B 的可能通路是氧自由基的生成,大鼠暴露至 CIH 显示心脏氧化应激增加,ROS 增加是 NF- κ B 激活的可能刺激物,并可能是 NF- κ B 激活引起的各种信号转导的共同通路^[12]。本研究结果显示,慢性间歇性低氧刺激大鼠心肌细胞表达 NF- κ B 增高,大鼠左心功能降低,而经 PDTC 干预组 NF- κ B 表达下降,大鼠左心室功能较正常组无明显异常,表明慢性间歇性低氧可能通过 NF- κ B 转录调节参与左心功能不全的发生。

本研究通过随机对照干预动物实验,发现慢性间歇性低氧大鼠左心功能降低,经 NF- κ B 抑制剂 PDTC 干预后,左心室功能较对照组无明显差异,初步表明 NF- κ B 在慢性间歇性低氧大鼠左心功能降低的发生机制中发挥作用。

【参考文献】

- [1] Zhao ZH, Sullivan C, Liu ZH, *et al.* Prevalence and clinical characteristics of sleep apnea in Chinese patients with heart failure[J]. *Int J Cardiol*, 2007, 118(1): 122-123.
- [2] Luo Q, Zhang HL, Tao XC, *et al.* Impact of untreated sleep apnea on prognosis of patients with congestive heart failure in China[J]. *Int J Cardiol*, 2010, 144(3): 420-422.
- [3] Zhao ZH, Liu ZH, Luo Q, *et al.* Positive pressure ventilation treatment reduces plasma levels of amino terminal-probrain natriuretic peptide in congestive heart failure patients with sleep apnea [J]. *Circ J*, 2006, 70 (5): 572-574.
- [4] Chen L, Einbinder E, Zhang Q, *et al.* Oxidative stress and left ventricular function with chronic intermittent hypoxia in rats [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(7): 915-920.
- [5] Chen L, Zhang L, Gan TX, *et al.* Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia [J]. *J Appl Physiol*, 2008, 104(1): 218-223.
- [6] 杨博,胡克,赵杨,等.阻塞性睡眠呼吸暂停犬模型肿瘤坏死因子与左心室功能的关系[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2006, 27(5): 593-596.
- [7] Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappa B in inflammation[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(11): 837-848.
- [8] Gordon JW, Shaw JA, Kirshenbaum LA. Multiple facets of NF-kappa B in the heart: to be or not to NF-kappa B [J]. *Circ Res*, 2011, 108(9): 1122-1132.
- [9] Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome[J]. *Circulation*, 2005, 112(17): 2660-2667.
- [10] Htoo AK, Greenberg H, Tongia S, *et al.* Activation of nuclear factor κ B in obstructive sleep apnea: a pathway leading to systemic inflammation[J]. *Sleep Breath*, 2006, 10(1): 43-50.
- [11] Greenberg H, Ye X, Wilson D, *et al.* Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor-kappa B in cardiovascular tissues *in vivo*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343(2): 591-596.
- [12] Nanduri J, Nanduri RP. Cellular mechanisms associated with intermittent hypoxia[J]. *Essays Biochem*, 2007, 43: 91-104.

(编辑:周宇红)

· 消 息 ·

中国科技核心期刊 《中华临床医师杂志(电子版)》2011 年度征稿、征订

《中华临床医师杂志(电子版)》是中国科技核心期刊,半月刊,全年出刊 24 期,定价 672 元,国内刊号 CN 11-9147/R,邮发代号 80-728,被万方数据库、中国期刊网、维普数据库、美国化学文摘、乌利希期刊指南、波兰哥白尼索引等国内外知名数据库收录。

2011 年度重点栏目征稿及 2011 年优惠征订详情请见中华临床医师杂志官方网站 www.clinicmed.net 的期刊动态。欢迎广大临床医师积极投稿并订阅杂志!欢迎各位专家组织、推荐、撰写重点栏目论文!

投稿邮箱:100035 北京市 100035-50 信箱 编辑部 收

投稿邮箱电子邮箱: Lcdoctor@163.com

电话:010-62219211

传真:010-62222508

网址: <http://www.clinicmed.net>