

核转录因子-κB 在急性心肌梗死血管内皮细胞损伤中的作用

廖新学 李欣 马中富 王礼春 杜志民 董吁刚 马虹

【摘要】 目的 观察急性心肌梗死(AMI)再灌注后核转录因子-κB(NF-κB)活性和血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、可溶性血栓调节蛋白(sTM)水平的动态变化,探讨心肌缺血/再灌注对内皮细胞损伤的作用及机制。方法 随机选取进行静脉溶栓再通的 AMI 患者(AMI 再灌注组,8 例),并以健康体检者 8 例作为正常对照组。以电泳迁移率变动分析法(EMSA)检测 NF-κB 活性,放射免疫法测定 TNF-α 含量,酶联免疫吸附试验测量 sTM 水平。结果 NF-κB 活性以及 TNF-α 和 sTM 水平在溶栓后 0.5 h 就明显升高,1 h 达高峰,3、12 和 24 h 逐渐下降;各时间点的数值均显著高于对照组(P 均 <0.05);1 h 时的各数值均显著高于 24 h (P 均 <0.05)。sTM 与 NF-κB 活性和 TNF-α 之间的动态变化有明显相关性(P 均 <0.05)。结论 AMI 再灌注后存在着 NF-κB 活化、TNF-α 增加和内皮细胞损伤;NF-κB 活化可能是造成血管内皮细胞损伤的重要机制之一。

【关键词】 血管内皮细胞; 核转录因子-κB; 心肌梗死,急性

Role of nuclear factor-κB in endothelial injury in acute myocardial infarction LIAO Xin-xue*, LI Xin, MA Zhong-fu, WANG Li-chun, DU Zhi-min, DONG Yu-gang, MA Hong. *The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China

Corresponding author: MA Hong (Email:sums-mahong@21cn.com)

【Abstract】 Objective To examine the change in nuclear factor-κB (NF-κB) activity, tumor necrosis factor-α (TNF-α) and soluble thrombomodulin (sTM) levels at different time following reperfusion in acute myocardial infarction (AMI), and to identify the role of ischemia/reperfusion after ischemia in injury to endothelial cells and its relevant mechanism. **Methods** AMI group included 8 randomly selected patients with AMI, and a normal control group ($n=8$) comprising individuals who underwent health check. NF-κB activity in monocytes was determined by electrophoretic mobility shift assays (EMSA). The level of TNF-α was measured by radio-immunity and sTM was measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The NF-κB activity, TNF-α and sTM levels raised dramatically at 0.5 hour after reperfusion, reaching peak at 1 hour and declined gradually at 3, 12 and 24 hours. The levels of all the determined parameters at every time point were significantly higher than that of normal control group, and their levels at 1 hour were significantly higher than that at 24 hours (all $P<0.05$). There was a positive correlation between the NF-κB activity and the levels of TNF-α and sTM (all $P<0.05$). **Conclusion** These results indicate that NF-κB is activated and the levels of TNF-α and sTM rise significantly after reperfusion in AMI. The activation of NF-κB maybe one of the most important pathogenic mechanism of endothelial injury.

【Key words】 endothelial cell; nuclear factor-κB; acute myocardial infarction

内皮细胞作为组织与血液之间的防线,它的损伤是导致许多疾病发生发展的重要环节。既往研究中已发现,在急性心肌梗死(AMI)患者中可溶性血栓调节蛋白(sTM)水平显著升高,表明有严重的内皮细胞损伤^[1]。核转录因子-κB(NF-κB)是细胞内调

节一系列重要因子产生的“基因开关”,调节着多种生长因子、趋化因子、黏附分子、细胞因子的表达。肿瘤坏死因子-α(TNF-α)是最具代表性的炎症因子之一,过度表达时可导致机体的免疫病理损伤,在动脉粥样硬化性疾病的发生发展中起了重要作用。本研究旨在观察 AMI 患者静脉溶栓后 NF-κB、TNF-α 和 sTM 水平的变化趋势,并探索三者之间的关系,以明确炎症反应在缺血/再灌注(I/R)所致内皮细胞损伤中的作用和机制。

1 资料与方法

1.1 研究对象:AMI 的诊断、静脉溶栓治疗和血管再通的判断按照中华医学会心血管病学分会的标

基金项目:广东省科技计划基金资助项目(2004B30601016, 2006B36004010);广东省自然科学基金资助项目(5001676)

作者单位:510080 广东广州,中山大学附属第一医院心内科(廖新学,王礼春,杜志民,董吁刚,马虹),急诊科(李欣),普内科(马中富)

通讯作者:马虹,Email:sums-mahong@21cn.com

作者简介:廖新学(1965-),男(汉族),广东省人,医学博士,副教授,中山研究方向为冠心病和高血压病,已发表文章近百篇。

准^[1]进行。选取 2006 年 6 月—2007 年 2 月住院且愿意配合试验的静脉溶栓再通 AMI 患者作为 AMI 再灌注组,排除合并有炎症、肿瘤、自身免疫性疾病、脑血管疾病、近期手术或外伤史、慢性心力衰竭的患者。AMI 再灌注组的溶栓药物采用重组组织型纤溶酶原激活剂。随机选取同期本院健康体检者(无心、肝、肾等器质性病变,抽血前未服用任何药物)作为正常对照组。

1.2 资料收集与病情观察:AMI 再灌注组在开始静脉溶栓后 0.5、1、3、12 和 24 h 分别采集静脉血 10 ml,注入含肝素的试管中;正常对照组于体检时采集一次静脉血。记录所有入选者的年龄、原发性高血压年限、糖尿病年限、吸烟年限、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)等指标。观察患者住院期间的主要心脏事件发生情况:心功能不全、严重心律失常、AMI 且需行紧急经皮冠状动脉腔内成形术(PTCA)治疗、心源性死亡等。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 细胞核提取物制备:将所采集的血液进行离心,取血浆,再参考文献[2]方法分离外周血单核细胞(PBMC),按照 Schreiber 方法提取核蛋白,以考马斯亮蓝法检测核提取物蛋白浓度,分装置于-80℃冰箱中保存备用。

1.3.2 NF-κB 活性检测:采用电泳迁移率变动分析法(EMSA)检测。探针使用与 NF-κB 一致性的双链寡核苷酸序列(5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'),5'端以[γ-³²P] ATP(北京亚辉公司)标记,标记和纯化过程按照 Gel Shift Assay System 试剂盒(美国 Promega 公司)说明书进行。配制体积分数为 4%的非变性聚丙烯酰胺凝胶,将细胞核提取物与 NF-κB 双链寡核苷酸探针进行结合反应,反应体系按纯水:Gel Shift Binding 5×buffer:核提取物:探针为 5:2:2:1,总体积 20 μl 上样;电泳后取出凝胶板,将凝胶用保鲜膜覆盖,放入装有 X 线片的暗盒中,在-70℃放射自显影 24 h。对 X 线片上电泳条带进行密度扫描,NF-κB 活性以面积×密度表示。

1.3.3 特异性鉴定:设空白对照、特异性竞争对照及非特异性竞争对照。空白对照为反应混合物中不加细胞核提取物。特异性竞争对照为先加入 50 倍浓度、未标记的 NF-κB 探针,5 min 后再加入核素标记的探针。非特异性竞争对照为先加入 50 倍浓度、未标记的激活蛋白-1(AP-1)一致性双链寡核苷酸,

5 min 后再加入核素标记的 NF-κB 探针。

1.4 TNF-α、sTM、肌酸激酶同工酶(CK-MB)水平测定:用放射免疫法测定血清 TNF-α 水平,试剂盒购自解放军总医院放射免疫研究所,操作按说明书进行。用双抗体夹心酶联免疫吸附试验测定 sTM 浓度,试剂盒由美国 American Diagnostica 公司提供,酶标仪为 BIO-RAD550 型。CK-MB 由本院生化实验室使用干片法测定。

1.5 统计学处理:使用 SPSS 10.0 软件,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和相关回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

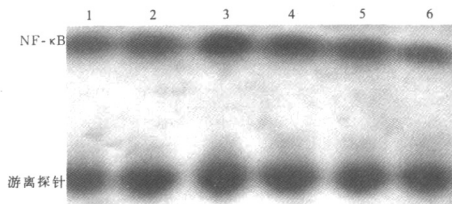
2.1 患者基本情况:符合诊断标准以及筛选条件的 AMI 再灌注组患者 8 例(男 4 例,女 4 例;年龄 46~78 岁,中位数年龄 63.5 岁),CK-MB 检测结果符合心梗诊断,患者均进行了静脉溶栓治疗并实现血管再通。正常对照组 8 例(男 5 例,女 3 例,中位数年龄 62.1 岁)。受试者的性别、年龄与 AMI 再灌注组比较差异无统计学意义(P 均 > 0.05),有可比性。

2.2 NF-κB 活性和 TNF-α、sTM 水平变化(表 1;图 1):PBMC 内 NF-κB 活性和 TNF-α、sTM 水平在静脉溶栓后 0.5 h 就有明显升高,在 1 h 达高峰,3 h 后逐渐下降。溶栓后各时间点 NF-κB 活性和 TNF-α、sTM 水平均显著高于正常对照组,且 1 h 时显著高于 24 h(P 均 < 0.05)。

表 1 各组 NF-κB 活性和 TNF-α、sTM 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	NF-κB (×10 ⁶)	TNF-α(μg/L)	sTM(μg/L)	CK-MB(U/L)
正常对照组	8	0.12±0.03	0.64±0.07	1.17±0.21	7.28±3.25
AMI 再灌注组 0.5 h	8	0.92±0.36*	2.87±0.31*	2.76±1.03*	8.39±3.11
1 h	8	1.38±0.42 ^{ab}	4.36±0.57 ^{ab}	4.14±1.42 ^{ab}	10.14±4.37
3 h	8	1.22±0.37*	3.92±0.40*	3.83±1.22*	13.75±6.42
12 h	8	0.84±0.29*	2.17±0.21*	3.04±0.56*	39.28±22.46*
24 h	8	0.63±0.19*	2.12±0.28*	2.45±0.85*	32.23±19.32*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与本组 24 h 比较,^b $P < 0.05$



1:正常对照组;2~6 依次为心梗再灌注组静脉溶栓后 0.5、1、3、12 和 24 h

图 1 EMSA 检测静脉溶栓后不同时间点 PBMC 内 NF-κB 活性

2.3 AMI 患者 NF- κ B 活性和 TNF- α 、sTM 水平之间动态变化总体相关性分析: NF- κ B 活性和 TNF- α 、sTM 水平之间的动态变化呈显著正相关。NF- κ B 与 TNF- α 呈直线相关关系 ($P < 0.05$), 相关系数 (r) 值为 0.97, 回归方程为 $y = 3.6885x - 0.6669$ 。NF- κ B 与 sTM 呈直线相关关系 ($P < 0.05$), r 值为 0.93, 方程为 $y = 2.5505x + 0.6476$ 。TNF- α 与 sTM 呈直线相关关系 ($r = 0.85$, $P < 0.05$), 回归方程为 $y = 0.6498x + 1.2373$ 。

3 讨论

内皮细胞参与调节血管紧张度、免疫反应、脂质代谢及内皮下基质合成, 使血管系统保持非凝血的状态。内皮细胞作为组织与血液之间的防线, 其损伤是导致许多疾病发生发展的重要环节。TM 是由血管内皮细胞合成并附着于内皮细胞膜表面的凝血酶受体, 当血管内皮细胞受损时, TM 便从细胞膜中脱落释放到血液中使血中 sTM 水平增高, Constans 等^[3]认为 sTM 是标志内皮损伤最有价值的指标之一。本试验中 sTM 水平在 AMI 溶栓再通后迅速出现升高, 然后逐渐回落, 表明在这一心肌 I/R 过程中存在着明显的内皮细胞损伤。Laude 等^[4]也发现心肌 I/R 过程中存在内皮细胞的损伤, 并证明内皮细胞的损伤与 I/R 造成的氧化应激有关。本试验表明, 过度的炎症反应是造成内皮细胞损伤的重要机制之一。

研究发现在缺血心肌内已有中性粒细胞聚集, 其数量可随缺血时间延长及再灌注而增加。再灌注损伤可使细胞膜磷脂降解, 释放出大量趋化因子吸引大量中性粒细胞聚集。活性氧增加可诱导内皮细胞表达黏附分子增加, 加剧了缺血组织内白细胞聚集和激活^[5]。激活的中性粒细胞可释放大量的炎症介质〔如 TNF- α 、白细胞介素-6(IL-6)〕, 这些介质一方面促进更多的白细胞聚集和浸润; 另一方面则造成过度的炎症反应, 导致细胞损伤。NF- κ B 几乎存在于所有细胞内, 与炎症反应有关的蛋白因子表达均受 NF- κ B 调控, 在免疫源性和非免疫源性炎症反应的发生中均发挥重要作用。在心肌的 I/R 过程中, 缺血、缺氧、活性氧、氧中毒、钙超载等都可引起 NF- κ B 的活化^[6]。活化的 NF- κ B 转移到细胞内与其特异性 DNA 位点结合, 发挥转录调控作用, TNF- α 就是其中最具有代表性的下游产物之一。过度表达的 TNF- α 通过直接作用于血管内皮细胞改变其通透性、增加白细胞与血管内皮细胞的黏附、与 IL-1 协同破坏内皮细胞并发动凝血过程等导致内皮细胞损

伤^[7]。有研究发现, NF- κ B 活化可能介导心肌 I/R 时的氧化应激损伤和再灌注后心肌细胞凋亡^[8-9]。Hofmann 等^[10]也发现在糖尿病视网膜病变患者中 sTM 水平和 NF- κ B 活化显著相关, 并认为 NF- κ B 可能是通过刺激黏附分子和组织因子的产生而损伤了内皮细胞, 并促进了动脉粥样硬化的发生发展。本研究结果显示, AMI 后 NF- κ B 活性和 TNF- α 水平在 I/R 早期阶段即迅速升高, 并于溶栓后 1 h 达高峰, 随后逐渐平缓下降; sTM 水平也呈现出类似的变化趋势, 这种相似的变化趋势与 AMI 的 I/R 病理生理机制相契合, 表明三者之间存在密切的内在联系, 提示在心肌 I/R 过程中, 中性粒细胞聚集、NF- κ B 活化、TNF- α 等炎症因子过度释放在血管内皮细胞损伤中发挥了重要作用。

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病分会, 中华心血管病杂志编辑委员会, 中国循环杂志编辑委员会. 急性心肌梗死诊断和治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2001, 29(12): 710-725.
- [2] Schreiber E, Matthias P, Müller M M, et al. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells[J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17(15): 6419-6423.
- [3] Constans J, Conri C. Circulating markers of endothelial function in cardiovascular disease[J]. Clin Chim Acta, 2006, 368(1-2): 33-47.
- [4] Laude K, Richard V, Thuillez C, et al. Coronary endothelial cells; a target of ischemia reperfusion and its treatment[J]? Arch Mal Coeur Vaiss, 2004, 97(3): 250-254.
- [5] 周四柱, 雷小勇, 廖端芳. 缺氧预适应对缺氧/复氧诱导内皮细胞-中性粒细胞黏附的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(3): 159-162.
- [6] 杨富国, 刘革新, 王力. 黄芩甲苷对缺氧/复氧损伤血管内皮细胞核转录因子- κ B 表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(6): 367-369.
- [7] Frantz S, Tillmanns J, Kuhlencordt P J, et al. Tissue-specific effects of the nuclear factor kappaB subunit p50 on myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Pathol, 2007, 171(2): 507-512.
- [8] 涂自智, 肖卫民, 刘梅冬, 等. 核转录因子- κ B 在热休克处理抑制过氧化氢所致心肌细胞损伤中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(7): 412-416.
- [9] 张良清, 徐军发, 蔡康荣, 等. 腺苷预处理对缺血/再灌注心肌细胞凋亡及核因子- κ B 表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(3): 158-160.
- [10] Hofmann M A, Schiekofer S, Isermann B, et al. Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- κ B[J]. Diabetologia, 1999, 42(2): 222-232.

(收稿日期: 2008-02-04 修回日期: 2008-05-03)

(本文编辑: 李银平)