

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxh.002849

白藜芦醇通过调节沉默信息调节因子 1/核转录因子-κB 通路改善高血压左心室重塑

黄 健,范忠才,程圣杰

(西南医科大学附属医院心血管内科,泸州 646000)

【摘要】目的:研究白藜芦醇(resveratrol,RES)对自发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rat,SHR)左心室重塑的影响及其对沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1,SIRT1)/核转录因子 κB(nuclear transcription factor-κB,NF-κB)信号通路的作用。**方法:**将 8 只 8 周龄雄性 Wistar-Kyoto(WKY)大鼠作为正常组(WKY 组),将 40 只 8 周龄雄性 SHR 随机分为 SHR 组、RES 组、EX527 组、RES+EX527 组、RES+吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamate,PDTC)组,每组 8 只,予以相应药物干预 12 周。测量大鼠体质量、收缩压、心脏超声、左心室质量、左心室质量指数(left ventricular mass index,LVMI)、心肌胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF)、氧化应激指标、SIRT1 和 NF-κB 以及炎症因子蛋白表达水平,观察 HE 和 Masson 染色下的心脏形态病理改变。**结果:**与 WKY 组[LVMI(2.12 ± 0.10) mg/g,CVF(0.18 ± 0.09)%],SIRT1 蛋白表达量 1.40 ± 0.05 ,NF-κB 蛋白表达量 0.46 ± 0.06]相比,SHR 组[LVMI(3.07 ± 0.07) mg/g,CVF(2.60 ± 0.56)%],SIRT1 蛋白表达量 0.78 ± 0.08 ,NF-κB 蛋白表达量 1.41 ± 0.08]左心室重塑程度严重,氧化应激和炎症因子水平及 NF-κB 表达明显增加($P < 0.05$),而 SIRT1 表达降低($P < 0.05$)。RES 组[LVMI(2.72 ± 0.09) mg/g,CVF(1.10 ± 0.30)%],SIRT1 蛋白表达量 0.99 ± 0.07 ,NF-κB 蛋白表达量 0.98 ± 0.12]较 SHR 组左心室重塑程度减轻,氧化应激和炎症因子水平及 NF-κB 表达降低($P < 0.05$),SIRT1 表达增加($P < 0.05$);而 EX527 组[LVMI(3.18 ± 0.08) mg/g,CVF(2.83 ± 0.98)%],SIRT1 蛋白表达量 0.60 ± 0.02 ,NF-κB 蛋白表达量 1.68 ± 0.07]结果与 RES 组相反。与 RES 组相比,RES+EX527 组有逆转 RES 改善左心室重塑的趋势;而 RES+PDTC 组更有改善左心室重塑的趋势。**结论:**RES 能改善 SHR 的左心室重塑,其机制可能与调节 SIRT1/NF-κB 通路从而减轻氧化应激和炎症反应损伤有关。

【关键词】白藜芦醇;左心室重塑;沉默信息调节因子 1;核转录因子 κB;自发性高血压大鼠

【中图分类号】R541.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2020-09-17

Resveratrol ameliorates hypertensive left ventricular remodeling by regulating the silent information regulator 1/nuclear transcription factor-κB pathway

Huang Jian, Fan Zhongcai, Cheng Shengjie

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University)

【Abstract】Objective: To study the effect of resveratrol(RES) on left ventricular remodeling in spontaneous hypertension rat(SHR) and its role in silent information regulator 1/nuclear transcription factor-κB(SIRT1/NF-κB) signaling pathway. **Methods:** Eight male Wistar-Kyoto(WKY) rats aged 8 weeks were taken as the normal group(WKY group), and 40 male SHR aged 8 weeks were randomly divided into SHR group,RES group,EX527 group,RES+EX527 group, and RES+pyrrolidine dithiocarbamate(PDTC) group, with 8 rats in each group,given corresponding drug intervention for 12 weeks. The rats' weight,systolic pressure,echocardiography, left ventricular mass,left ventricular mass index(LVMI),myocardial collagen volume fraction(CVF),oxidative stress index,SIRT1 and NF-κB protein expression levels, and inflammatory factors protein expression levels were measured. And the morphological and pathological changes of the heart under HE and Masson staining were observed. **Results:** Compared with WKY group[LVMI(2.12 ± 0.10) mg/g,CVF(0.18 ± 0.09)%],SIRT1 protein expression(1.40 ± 0.05),NF-κB protein expression(0.46 ± 0.06)],SHR group[LVMI(3.07 ± 0.07) mg/g,CVF(2.60 ± 0.56)%],SIRT1 protein expression(0.78 ± 0.08),NF-κB protein expression(1.41 ± 0.08)] showed severe left ventricular remodeling,significantly increased levels of oxidative stress and inflammatory factors as well as NF-κB expression($P < 0.05$),and decreased SIRT1 expression($P < 0.05$). In RES group[LVMI(2.72 ± 0.09) mg/g,CVF(1.10 ± 0.30)%],SIRT1 protein expression(0.99 ± 0.07),NF-κB protein expression(0.98 ± 0.12)],compared with SHR group, left ventricular

作者介绍:黄 健,Email:517294205@qq.com,

研究方向:心血管疾病研究和治疗。

通信作者:范忠才,Email:zhongcai9665@126.com。

基金项目:西南医科大学-四川省心血管疾病防治协同创新中心资助

项目(编号:xtcx-2016-23)。

优先出版:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20210519.1414.010.html>

(2021-05-19)

remodeling degree was reduced, oxidative stress and inflammatory factors as well as NF- κ B expression levels were decreased ($P < 0.05$), and SIRT1 expression was increased ($P < 0.05$). The results of EX527 group [LVMI(3.18 ± 0.08) mg/g, CVF(2.83 ± 0.98)%, SIRT1 protein expression(0.60 ± 0.02), NF- κ B protein expression(1.68 ± 0.07)] were opposite to those of RES group. Compared with RES group, RES+EX527 group showed a trend of reversing RES to ameliorate left ventricular remodeling. RES+PDTC group showed a tendency to further ameliorate left ventricular remodeling. **Conclusion:** RES can ameliorate left ventricular remodeling of SHR, and its mechanism may be related to regulation of SIRT1/NF- κ B pathway to reduce oxidative stress and inflammatory response damage.

[Key words] resveratrol; left ventricular remodeling; silent information regulator 1; nuclear transcription factor- κ B; spontaneous hypertension rat

高血压是最常见的心血管疾病之一,长期血压升高可导致左心室肥厚、心肌纤维化以及心脏扩大,此过程即为左心室重塑(left ventricular remodeling)。研究发现,沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)具有明确的抑制核转录因子 κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)信号的作用^[1],从而抑制下游基因转录,减少炎症因子的产生,而炎症反应可能参与高血压左心室重塑形成过程^[2]。白藜芦醇(resveratrol, RES)是一种多酚类化合物,是目前实验研究中使用最广泛的 SIRT1 激动剂,具有抗氧化、抗炎症、抗动脉粥样硬化、抗凋亡、抗胰岛素抵抗、抗血小板、降血脂等心血管保护作用^[3-4],但对高血压心脏保护作用鲜有报道。本实验予以 RES 干预自发性高血压大鼠(spontaneous hypertension rat, SHR),并设立 SIRT1 抑制剂 EX527 干预组、NF- κ B 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)干预组作为对照,探讨 RES 改善左心室重塑的作用及其机制,从而对高血压病寻找新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂与设备

1.1.1 实验动物 SPF 级健康 8 周龄雄性 SHR 40 只,体质量(198.10 ± 21.65) g,批号 1100111911081681;SPF 级健康 8 周龄雄性 Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠 8 只,体质量(198.20 ± 13.85) g,批号 1100111911081682;均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0006。

1.1.2 主要试剂 RES 购自 Solarbio 公司(批号 1008G022);EX527 购自 MedChem Express 公司(货号 HY-15452);PDTC 购自 Macklin 公司(批号 C10838402);甲醛购自成都市科隆化学有限公司(批号 2019091901);活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒购自上海桥社(货号 RA20771);丙二醛

(malondialdehyde, MDA)试剂盒购自上海桥社(货号 RA20007);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒购自上海桥社(货号 RA20008);SIRT1 抗体购自 Abcam 公司(货号 ab189494);NF- κ B 抗体购自 Abcam 公司(货号 ab16502);转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)抗体购自 Abcam 公司(货号 ab215715);肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)抗体购自 Abcam 公司(货号 ab205587);白介素-6(interleukin-6, IL-6)抗体购自 Abcam 公司(货号 DF6087)。

1.1.3 主要仪器 大鼠无创血压计(上海玉研科学仪器有限公司);转轮式切片机(徕卡-2016);JT-12S 自动组织脱水机(武汉俊杰电子有限公司);BMJ-A 型包埋机(常州中威电子仪器有限公司);PHY-Ⅲ型病理组织漂烘仪(常州中威电子仪器有限公司);RS36 型全自动染色机(常州派斯杰医疗设备有限公司);BA210Digital 数码三目摄像显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司);Quantity one 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司);电泳仪、电泳槽(Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组 所有大鼠饲养于西南医科大学恒温动物实验室,每笼 6 只,室温(23 ± 2)℃,湿度 45%~65%。实验期间大鼠进食普通饲料,自由摄食和饮水,人工照明,明暗交替各 12 h(由西南医科大学动物实验中心技术人员负责),饲养环境符合实验动物环境设施要求。

所有大鼠适应性喂养 1 周后进行分组:WKY 作为正常对照组[$n=8$,生理盐水(normal saline, NS)1 mL/d 灌胃、NS 1 mL/d 腹腔注射];SHR 分为 SHR 空白组[$n=8$, NS 1 mL/d 灌胃、NS 1 mL/d 腹腔注射]、RES 组[$n=8$, RES 50 mg/(kg·d)灌胃、NS 1 mL/d 腹腔注射]、EX527 组[$n=8$, NS 1 mL/d 灌胃、EX527 5 mg/(kg·d)腹腔注射]、RES+EX527 组[$n=8$, RES 50 mg/(kg·d)灌胃、EX527 5 mg/(kg·d)腹腔注射]、RES+PDTC 组[$n=8$, RES 50 mg/(kg·d)灌胃、PDTC 100 mg/(kg·d)灌胃、NS 1 mL/d 腹腔注射]。各组干预 12 周,12 周以后将大鼠进行心脏超声检测并取出心脏标本进行其他检测。

1.2.2 体质量及血压测量 实验过程中每 2 周记录大鼠体质量、用大鼠无创血压计测定并记录大鼠收缩压。

1.2.3 心脏超声检测 实验干预 12 周之后用心脏超声测量大鼠左心室及室间隔厚度并评估大鼠心功能,记录左室收缩末期内径(left ventricular end-systolic inner diameter, LVEDs)、

左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic diameter, LVEDd)、室间隔舒张末期厚度(interventricular septum end-diastolic thickness, ISVD)、左室舒张末期后壁厚度(left ventricular end-diastolic posterior wall thickness, LVPWd)和左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。

1.2.4 心脏组织的取材及称重 12 周后,将所有大鼠称重后予以 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,分离出左心室(包括室间隔),称量左心室质量(left ventricular mass, LVM),以左心室质量(mg)与体质量(g)之比作为左心室质量指数(left ventricular mass index, LVMI)。

1.2.5 心脏组织病理学观察 将左心室组织石蜡包埋、制作切片,HE 染色观察心肌细胞形态及结构变化,Masson 染色观察心肌间质纤维化程度并用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件测定心肌胶原容积分数(collagen volume fraction, CVF), $CVF(\%) = \text{胶原面积}/\text{视野总面积} \times 100\%$ 。

1.2.6 ELISA 测定氧化应激指标 根据相应 ELISA 试剂盒的说明方法,测定各组大鼠左心室组织 ROS 和 MDA 的含量以及 SOD 的活性。

1.2.7 Western blot 测定蛋白表达水平 Western blot 测定 SIRT1、NF-κB、TGF-β1、TNF-α 和 IL-6 的蛋白表达水平,用凝胶成像系统分析目标条带的灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组数据之间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 大鼠体质量及血压的比较

各组大鼠体质量随年龄增长而增加,组间无统计学差异($P>0.05$)。高血压各组大鼠收缩压组间差异无统计学意义($P>0.05$),但均明显高于 WKY 组($P<0.05$);而 WKY 组大鼠收缩压较实验前无明显变化($P=0.596$)(表 1、图 1)。

2.2 LVM、LVMI 及心脏超声数据比较

高血压各组大鼠 LVM、LVMI 均明显大于 WKY 对照组($P<0.05$)。与 SHR 组相比,RES 组 LVM、LVMI 均明显降低(LVM: $P=0.005$, LVMI: $P=0.000$);EX527 组 LVMI 升高($P=0.011$),LVM 差异不具有统计学意义($P=0.409$)。与 RES 组相比,RES+EX527 组 LVMI 升高($P=0.023$),LVM 差异不具有统计学意义($P=0.123$);RES+PDTC 组 LVM、LVMI 均降低(LVM: $P=0.032$, LVMI: $P=0.013$)(表 2、图 2)。与 WKY 对照组相比,心脏超声提示高血压各组出现了不同程度的左心室肥厚,各组大鼠 LVEF 差异无统计学意义($P>0.05$)(表 3、图 3、图 4)。

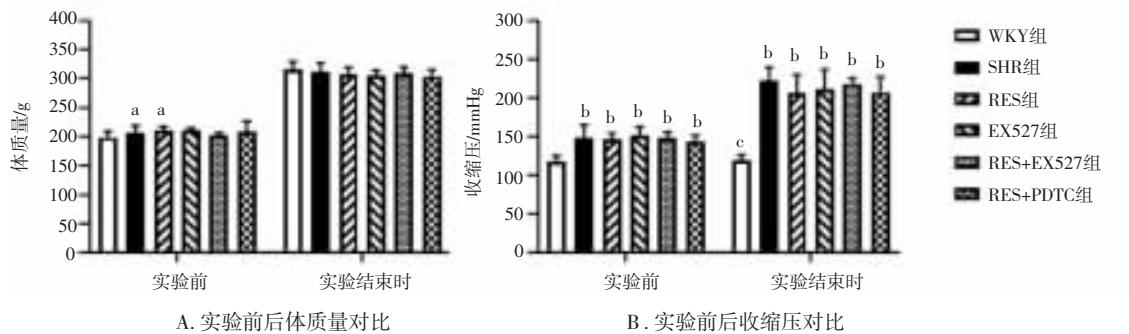
2.3 心肌细胞形态结构和心肌纤维化的比较

光镜下观察各组大鼠心肌细胞 HE 染色和 Masson 染色,可见 WKY 组心肌纤维结构完整清晰、形态正常;SHR 组和 SHR+EX527 组心肌细胞明显肥大,均有不同程度心肌纤维坏死,可见较多成纤维细胞和纤维细胞增生;RES 组和 RES+EX527 组心肌细胞肥大,少量心肌纤维坏死,可见少量的成

表 1 各组大鼠体质量和收缩压的变化($n=8, \bar{x} \pm s$)

分组	体质量/g		收缩压/mmHg	
	实验前	实验结束时	实验前	实验结束时
WKY组	198.70 ± 10.66	314.80 ± 14.70	117.10 ± 8.19	119.30 ± 7.50 ^c
SHR组	206.80 ± 12.25	311.90 ± 15.52	148.80 ± 16.65 ^b	221.50 ± 18.06 ^b
RES组	210.20 ± 7.17 ^a	307.00 ± 12.54	147.00 ± 7.48 ^b	206.30 ± 23.89 ^b
EX527组	209.80 ± 5.12 ^a	304.90 ± 9.27	151.50 ± 11.21 ^b	210.80 ± 26.09 ^b
RES+EX527组	201.30 ± 5.45	309.40 ± 10.61	148.80 ± 7.09 ^b	218.10 ± 7.57 ^b
RES+PDTC组	208.80 ± 17.72	303.70 ± 11.59	143.80 ± 7.78 ^b	206.90 ± 20.31 ^b
F 值	1.615	0.908	12.440	34.060
P 值	0.177	0.485	0.000	0.000

注:a,与同期 WKY 组相比, $P<0.05$;b:与同期 WKY 组相比, $P<0.01$;c:与实验前 WKY 组相比, $P>0.05$



注:a,与同期 WKY 组相比, $P<0.05$;b:与同期 WKY 组相比, $P<0.01$;c:与实验前 WKY 组相比, $P>0.05$

图 1 各组大鼠体质量和收缩压的变化($n=8, \bar{x} \pm s$)

纤维细胞和纤维细胞增生;RES+PDTC 心肌细胞稍肥大,间质内可见少量成纤维细胞增生(图 5、图 6)。

高血压各组 CVF 较 WKY 对照组均升高($P<0.05$)。与 SHR 组相比,RES 组 CVF 明显降低($P=0.001$);EX527 组 CVF 与之差异不具有统计学意义($P=0.667$)。与 RES 组相比,RES+EX527 组 CVF 增加($P=0.027$);RES+PDTC 组 CVF 降低($P=0.032$)(表 2、图 2)。

表 2 各组大鼠 LVM、LVMI、CVF 比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	LVM/mg	LVMI/(mg·g ⁻¹)	CVF/%
WKY组	667.80 ± 46.44	2.12 ± 0.10	0.18 ± 0.09
SHR组	942.20 ± 45.77 ^a	3.07 ± 0.07 ^a	2.60 ± 0.56 ^a
RES组	831.20 ± 44.56 ^{ab}	2.72 ± 0.09 ^{ab}	1.10 ± 0.30 ^{ab}
EX527组	965.80 ± 39.73 ^{ac}	3.18 ± 0.08 ^{ace}	2.83 ± 0.98 ^{ac}
RES+EX527组	878.80 ± 42.79 ^a	2.87 ± 0.08 ^{abd}	1.90 ± 0.59 ^{ad}
RES+PDTC组	760.60 ± 30.44 ^{abd}	2.50 ± 0.11 ^{abd}	0.57 ± 0.34 ^{adf}
F 值	35.060	96.530	19.150
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a:与 WKY 组相比, $P<0.01$;b:与 SHR 组相比, $P<0.01$;c:与 RES 组相比, $P<0.01$;d:与 RES 组相比, $P<0.05$;e:与 SHR 组相比, $P<0.05$;f:与 WKY 组相比, $P<0.05$

2.4 各组大鼠 ROS、MDA 及 SOD 比较

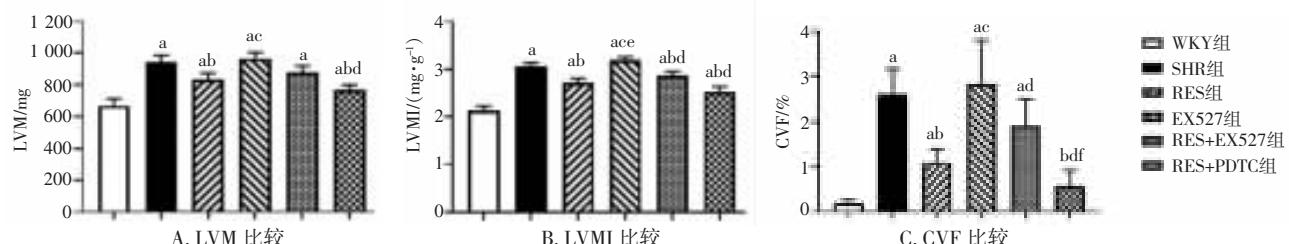
与 WKY 对照组相比,RES+PDTC 组 ROS、MDA 含量增多($ROS:P=0.004, MDA:P=0.021$),SOD 活性差异无统计学意义($P=0.198$);其余高血压试验组 ROS、MDA 含量增多($P<0.05$),

SOD 活性降低($P<0.05$)。与 SHR 组相比,RES 组 ROS 含量减少($P=0.029$),MDA 含量差异无统计学意义($P=0.067$),SOD 活性升高($P=0.003$);EX527 组 ROS、MDA 含量增多,SOD 活性降低,差异均有统计学意义($ROS:P=0.011, MDA:P=0.007, SOD:P=0.004$)。与 RES 组相比,RES+EX527 组 ROS、MDA 含量有所增多,SOD 活性有所降低,但差异均无统计学意义($ROS:P=0.284, MDA:P=0.154, SOD:P=0.085$);RES+PDTC 组 ROS 含量减少($P=0.038$),MDA 含量和 SOD 活性差异无统计学意义($MDA:P=0.085, SOD:P=0.135$)(表 4、图 7)。

2.5 各组大鼠 SIRT1 及 NF-κB 蛋白和 TGF-β1、TNF-α 及 IL-6 蛋白表达比较

与 WKY 对照组相比,高血压试验组 SIRT1 蛋白表达均降低($P<0.05$),NF-κB 蛋白表达均增加($P<0.05$)。与 SHR 组相比,RES 组 SIRT1 蛋白表达增加($P=0.02$),NF-κB 蛋白表达降低($P=0.000$);EX527 组 SIRT1 蛋白表达降低($P=0.001$),NF-κB 蛋白表达增加($P=0.000$)。与 RES 组相比,RES+EX527 组 SIRT1 蛋白表达降低($P=0.003$),NF-κB 蛋白表达差异不明显($P=0.101$);RES+PDTC 组 SIRT1 蛋白表达无统计学差异($P=0.938$),NF-κB 蛋白表达明显降低($P=0.000$)(表 5、图 8、图 9)。

与 WKY 对照组相比,高血压试验组 TGF-β1、TNF-α 及 IL-6 蛋白表达均增加($P<0.05$)。与 SHR 组相比,RES 组 TGF-β1、TNF-α 及 IL-6 蛋白表达明显降低($TGF-β1:P=0.000, TNF-α:P=0.000, IL-6:P=0.000$);EX527 组 TGF-β1、TNF-α 及 IL-6 蛋白表达增加($TGF-β1:P=0.001, TNF-α:P=0.033, IL-6:P=0.000$)。与 RES 组相比,RES+EX527 组 TGF-β1、



注:a:与 WKY 组相比, $P<0.01$;b:与 SHR 组相比, $P<0.01$;c:与 RES 组相比, $P<0.01$;d:与 RES 组相比, $P<0.05$;e:与 SHR 组相比, $P<0.05$;f:与 WKY 组相比, $P<0.05$

图 2 各组大鼠 LVM、LVMI、CVF 比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

表 3 各组大鼠心脏超声数据比较($n=3, \bar{x} \pm s$)

分组	LVEDd/mm	LVEDs/mm	ISVD/mm	LVPWd/mm	LVEF/%
WKY组	6.98 ± 0.11	3.60 ± 0.25	1.47 ± 0.09	1.50 ± 0.08	84.67 ± 2.52
SHR组	5.47 ± 0.21 ^a	3.01 ± 0.13 ^b	1.94 ± 0.06 ^a	2.02 ± 0.19 ^b	83.00 ± 2.00
RES组	6.45 ± 0.24 ^{bc}	3.60 ± 0.30 ^e	1.74 ± 0.06 ^{bc}	1.59 ± 0.06 ^e	82.67 ± 2.52
EX527组	5.05 ± 0.38 ^{ad}	2.68 ± 0.17 ^d	2.05 ± 0.11 ^{ad}	2.01 ± 0.24 ^{bf}	79.67 ± 2.52
RES+EX527组	6.08 ± 0.46 ^b	3.18 ± 0.46	1.83 ± 0.04 ^a	1.78 ± 0.06 ^{ef}	82.00 ± 3.46
RES+PDTC组	6.64 ± 0.22 ^c	3.60 ± 0.27 ^e	1.61 ± 0.04 ^{cd}	1.55 ± 0.11 ^e	83.67 ± 4.62
F 值	18.550	5.615	26.830	8.404	0.929
P 值	0.000	0.007	0.000	0.001	0.496

注:a:与 WKY 组相比, $P<0.01$;b:与 WKY 组相比, $P<0.05$;c:与 SHR 组相比, $P<0.01$;d:与 RES 组相比, $P<0.01$;e:与 SHR 组相比, $P<0.05$;f:与 RES 组相比, $P<0.05$

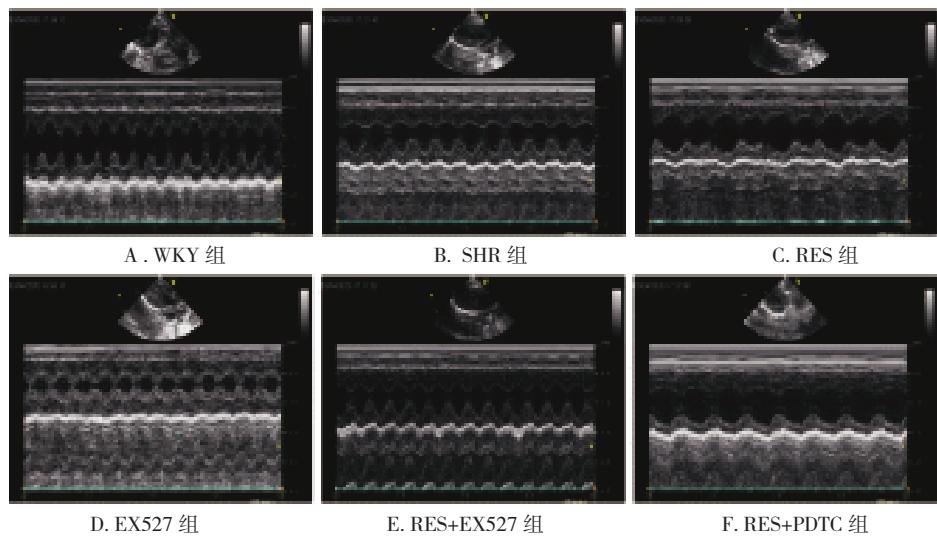
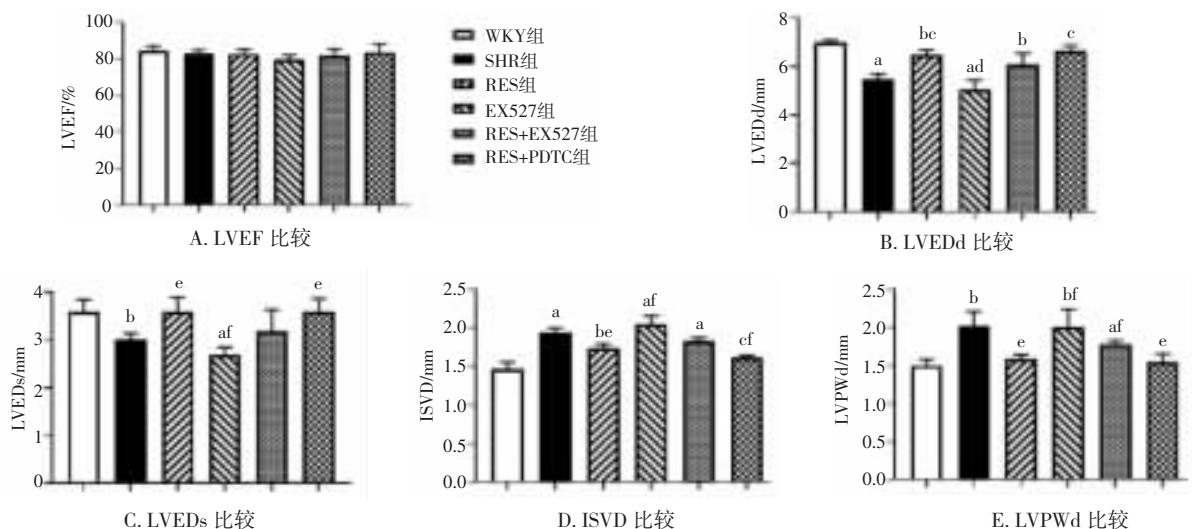


图 3 各组大鼠心脏超声图像



注: a. 与 WKY 组相比, $P < 0.01$; b. 与 WKY 组相比, $P < 0.05$; c. 与 SHR 组相比, $P < 0.01$; d. 与 RES 组相比, $P < 0.01$; e. 与 SHR 组相比, $P < 0.05$; f. 与 RES 组相比, $P < 0.05$

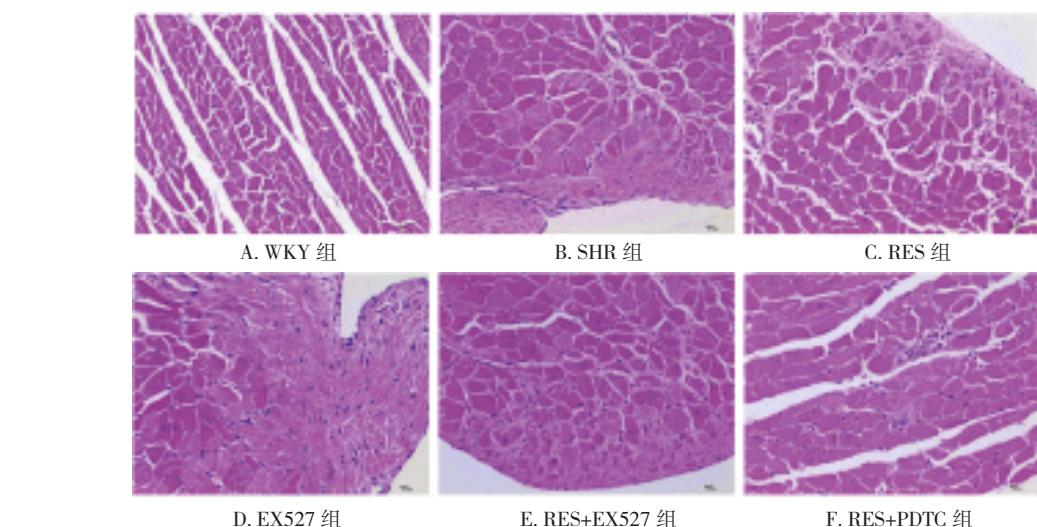
图 4 各组大鼠心脏超声数据比较 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

图 5 各组大鼠 HE 染色 (400×)

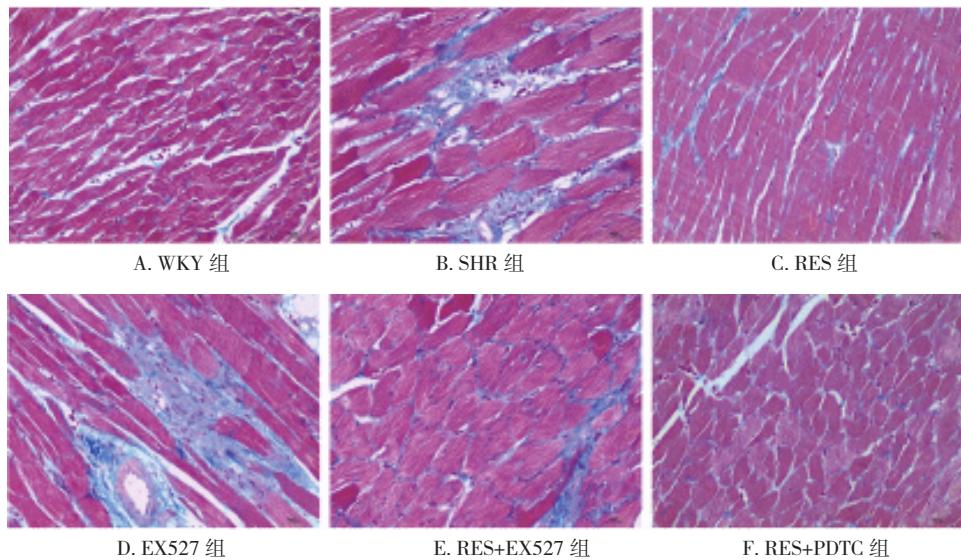
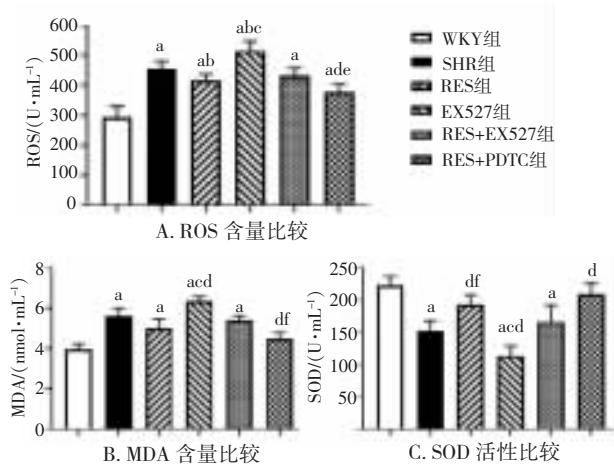


图 6 各组大鼠 Masson 染色 (400×)

表 4 各组大鼠 ROS、MDA 及 SOD 比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	ROS /(U·mL ⁻¹)	MDA /(nmol·mL ⁻¹)	SOD /(U·mL ⁻¹)
WKY组	293.94 ± 36.67	3.95 ± 0.28	222.56 ± 13.90
SHR组	456.22 ± 25.55 ^a	5.59 ± 0.40 ^a	152.50 ± 15.22 ^a
RES组	420.26 ± 23.84 ^{ab}	4.98 ± 0.49 ^a	192.40 ± 15.15 ^{df}
EX527组	515.98 ± 31.64 ^{abc}	6.34 ± 0.24 ^{acd}	113.50 ± 15.32 ^{acd}
RES+EX527组	433.28 ± 24.83 ^a	5.37 ± 0.25 ^a	166.08 ± 25.79 ^a
RES+PDTc组	376.64 ± 28.25 ^{ade}	4.48 ± 0.30 ^{ef}	209.02 ± 16.45 ^d
F 值	34.750	30.950	26.580
P 值	0.000	0.000	0.000

注: a: 与 WKY 组相比, $P < 0.01$; b: 与 SHR 组相比, $P < 0.05$; c: 与 RES 组相比, $P < 0.01$; d: 与 SHR 组相比, $P < 0.01$; e: 与 RES 组相比, $P < 0.05$; f: 与 WKY 组相比, $P < 0.05$

图 7 各组大鼠 ROS、MDA 及 SOD 比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

TNF- α 及 IL-6 蛋白表达增加 (TGF- β 1: $P=0.004$, TNF- α : $P=0.040$, IL-6: $P=0.008$); RES+PDTc 组 TGF- β 1 和 IL-6 蛋白表达降低 (TGF- β 1: $P=0.005$, IL-6: $P=0.003$), TNF- α 蛋白表达有所降低, 但差异无统计学意义 ($P=0.056$) (表 6、图 8、图 9)。

表 5 各组大鼠 SIRT1、NF- κ B 蛋白表达比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

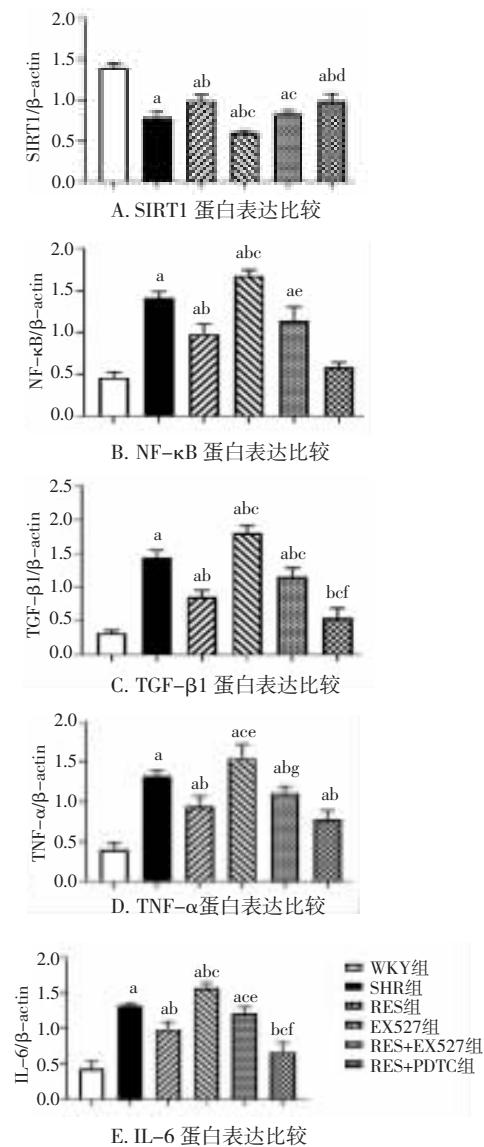
分组	SIRT1/ β -actin	NF- κ B/ β -actin
WKY组	1.40 ± 0.05	0.46 ± 0.06
SHR组	0.78 ± 0.08 ^a	1.41 ± 0.08 ^a
RES组	0.99 ± 0.07 ^{ab}	0.98 ± 0.12 ^{ab}
EX527组	0.60 ± 0.02 ^{abc}	1.68 ± 0.07 ^{abc}
RES+EX527组	0.82 ± 0.05 ^{ac}	1.14 ± 0.16 ^{ac}
RES+PDTc组	0.99 ± 0.09 ^{abd}	0.59 ± 0.06 ^{bef}
F 值	90.660	116.200
P 值	0.000	0.000

注: a: 与 WKY 组相比, $P < 0.01$; b: 与 SHR 组相比, $P < 0.01$; c: 与 RES 组相比, $P < 0.01$; d: 与 RES 组相比, $P > 0.05$; e: 与 SHR 组相比, $P < 0.05$; f: 与 WKY 组相比, $P < 0.05$

表 6 各组大鼠 TGF- β 1、TNF- α 及 IL-6 蛋白表达比较
($n=5, \bar{x} \pm s$)

分组	TGF- β 1/ β -actin	TNF- α / β -actin	IL-6/ β -actin
WKY组	0.33 ± 0.04	0.41 ± 0.08	0.44 ± 0.10
SHR组	1.44 ± 0.11 ^a	1.32 ± 0.07 ^a	1.32 ± 0.04 ^a
RES组	0.86 ± 0.10 ^{ab}	0.95 ± 0.12 ^{ab}	0.99 ± 0.11 ^{ab}
EX527组	1.80 ± 0.11 ^{abc}	1.54 ± 0.18 ^{ace}	1.57 ± 0.08 ^{abc}
RES+EX527组	1.15 ± 0.13 ^{abc}	1.11 ± 0.09 ^{abg}	1.22 ± 0.09 ^{ace}
RES+PDTc组	0.55 ± 0.15 ^{bef}	0.78 ± 0.11 ^{ab}	0.67 ± 0.14 ^{bef}
F 值	122.700	61.490	95.640
P 值	0.000	0.000	0.000

注: a: 与 WKY 组相比, $P < 0.01$; b: 与 SHR 组相比, $P < 0.01$; c: 与 RES 组相比, $P < 0.01$; e: 与 SHR 组相比, $P < 0.05$; f: 与 WKY 组相比, $P < 0.05$; g: 与 RES 组相比, $P < 0.05$



注:a,与WKY组相比, $P<0.01$;b:与SHR组相比, $P<0.01$;c:与RES组相比, $P<0.01$;d:与RES组相比, $P>0.05$;e:与SHR组相比, $P<0.05$;f:与WKY组相比, $P<0.05$;g:与RES组相比, $P<0.05$

图8 各组大鼠SIRT1、NF-κB、TGF-β1、TNF-α及IL-6蛋白表达比较($n=5, \bar{x} \pm s$)

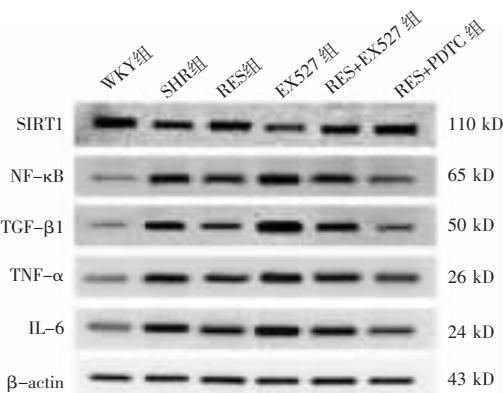


图9 各组大鼠SIRT1、NF-κB、TGF-β1、TNF-α及IL-6蛋白表达比较

3 讨论

左心室重塑是高血压最常见的心脏损害,与心律失常、心力衰竭、猝死等密切相关,是心力衰竭发生发展的基础。因此,减缓和逆转左心室重塑对改善患者预后、提高患者生活质量、降低死亡率有重要意义。目前控制血压、改善左心室重塑、治疗心力衰竭的药物通常包括血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素Ⅱ受体阻滞剂、β受体阻滞剂、钙通道拮抗剂和利尿剂等^[5],但治疗效果不理想。即便多种药物联用,死亡率仍然很高,且以上药物作用靶点单一、存在不同方面不同程度的不良反应与禁忌证。因此,对于高血压病的治疗,为降低心脏危险事件发生的风险、延缓疾病发展进程、改善和维持心脏的正常功能,探索左心室重塑形成机制、研究相关通路并寻找新的治疗靶点至关重要。

左心室重塑是一个极为复杂的病理过程,其确切机制仍不十分明确。研究表明,氧化应激、炎症反应是其产生的重要机制之一^[6-7]。高血压病程中,心肌肥大刺激因素如血管紧张素Ⅱ、儿茶酚胺类、细胞因子和生物力学拉伸会诱导心肌细胞中的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶和线粒体产生过多的活性氧ROS和MDA,而SOD活性降低,造成心肌抗氧化能力降低,氧化损伤增加^[8-9]。细胞未受刺激时,NF-κB二聚体(p50/p65)在胞浆中与其抑制性蛋白IκB结合,氧化应激产生的ROS可以导致IκB磷酸化、泛素化^[10],再被26S蛋白水解酶复合体降解,使NF-κB二聚体·IκB复合物分离而暴露激活,激活的NF-κB进入细胞核,发挥转录功能起动下游基因的转录,可以使心肌细胞产生众多的细胞因子如TGF-β1、TNF-α、IL-6等,这些细胞因子产生炎症反应参与心肌肥厚的形成^[11]。SIRT1可能有抑制这一过程的作用,SIRT1使NF-κB的p65亚基的310位的赖氨酸残基脱去乙酰基,这种脱乙酰化作用抑制了p65的转录活性并进一步抑制随后的下游基因转录,减少了炎症因子TGF-β1、TNF-α、IL-6等的产生,从而可减轻炎症反应^[12]。PDTC是氨基甲酸盐的一种,属于抗氧化剂,是NF-κB的特异性抑制剂,主要通过抑制IκB降解或者抑制NF-κB(P65),阻碍NF-κB向核移位,从而达到抑制NF-κB活性的作用^[13]。RES作为SIRT1目前研究中使用最广泛的激活剂,已有多项研究证实其可激活SIRT1并通过抑制NF-κB途径在抗动脉粥样硬化中发挥重要

作用^[14-15],但尚未发现其运用于对抗高血压左心室重塑的相关研究。

本实验选取 WKY 作为正常血压对照组,SHR 为高血压模型组。实验结果表明,WKY 组实验前后血压无明显变化,高血压各组大鼠的血压随年龄增长而逐渐升高,但组间比较无统计学差异。这一结果表明 SHR 能有效发生高血压,且实验选取的药物未明显影响大鼠血压。较正常组大鼠相比,高血压大鼠 SIRT1 蛋白表达减少,NF-κB 蛋白表达增多,左心室肥厚、心脏变大,部分大鼠心腔扩大、心功能下降,病理切片可见心肌细胞肥大、心肌纤维坏死、心肌纤维化严重、氧化应激及炎症反应程度严重。予以 SIRT1 激活剂 RES 干预后较高血压空白组相比,SIRT1 表达明显增多,NF-κB 表达明显下降,左心室肥厚、心脏变大明显改善,减轻了心肌细胞肥大、心肌纤维坏死、心肌纤维化、氧化应激及炎症反应程度;而予以 SIRT1 抑制剂 EX527 干预后较高血压空白组相比,SIRT1 表达明显下降,NF-κB 表达明显增多,左心室肥厚、心肌纤维化程度有加重趋势,氧化应激及炎症反应程度增加;同时予以 RES 和 EX527 干预的 SHR,SIRT1 表达、NF-κB 表达、左心室肥厚及纤维化程度、氧化应激及炎症反应程度均基本介于高血压空白组和 RES 干预组之间。由此可推断,RES 能增加 SHR 的 SIRT1 蛋白表达,进而抑制 NF-κB 蛋白及随后的炎症因子蛋白表达,故可减轻左心室肥厚及心肌纤维化,氧化应激程度可能伴随左心室重塑的改善而减轻;而 EX527 与 RES 作用相反,有加重左心室重塑的趋势,与 RES 同时使用时,还可拮抗 RES 对 SIRT1 的激活效应而一定程度逆转 RES 改善左心室重塑的作用。这证明其可通过激活 SIRT1 而抑制 NF-κB 信号通路以改善高血压左心室重塑。同时予以 RES 和 PDTC 干预的 SHR 其 SIRT1 表达较 RES 组无明显差异而 NF-κB 表达明显降低,左心室重塑和炎症反应程度较 RES 组更加改善,进一步证明 NF-κB 表达后产生的炎症反应参与了左心室重塑过程,可通过抑制 NF-κB 表达进一步改善高血压左心室重塑。

本实验的不足之处是心脏超声样本量太少。最初每组只随机选取 3 只大鼠做各项检测,但为了使实验更为严谨,后补充实验每组增加 2 只做检测,故 ELISA、Western blot、CVF 等统计的样本量为 5;但因所有大鼠均已处死,无法增加超声样本量,故心脏超声样本量仍为 3,但经统计可发现心脏超声差异符合实验趋势。

综上所述,RES 可以减少高血压病程中的心肌肥大、心肌纤维坏死、心肌纤维化,从而改善高血压左心室重塑,减缓高血压心脏损害,其保护作用可能是通过调节 SIRT1/NF-κB 信号通路、减轻氧化应激及炎症反应对心肌的损害而实现的。

参 考 文 献

- [1] 王 晓,葛勤敏.去乙酰化酶 SIRT1 对氧化应激的调控[J].现代生物医学进展,2015,15(30):5974-5976,5969.
- [2] Ni X,Wang A,Zhang L,et al. Up-regulation of gap junction in peripheral blood T lymphocytes contributes to the inflammatory response in essential hypertension[J]. PLoS One,2017,12(9):e0184773.
- [3] 潘 珺.白藜芦醇通过 SIRT1/NF-κB/CD40 途径调控动脉粥样硬化免疫炎性反应的机制研究[D].福州:福建医科大学,2017.
- [4] Zordoky BN,Robertson IM,Dyck JR. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases[J]. Biochim Biophys Acta,2015,1852(6):1155-1177.
- [5] 朱广旋,左建丽,许 林,等.中药有效成分逆转左室心肌肥厚的研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(17):228-234.
- [6] Korsager Larsen M,Matchkov VV. Hypertension and physical exercise;the role of oxidative stress[J]. Medicina(Kaunas),2016,52(1):19-27.
- [7] Shenasa M,Shenasa H. Hypertension, left ventricular hypertrophy, and sudden cardiac death[J]. Int J Cardiol,2017,237:60-63.
- [8] Reckelhoff JF,Romero DG,Yanes Cardozo LL. Sex,oxidative stress, and hypertension;insights from animal models[J]. Physiology(Bethesda),2019,34(3):178-188.
- [9] Sinha N,Dabla PK. Oxidative stress and antioxidants in hypertension:a current review[J]. Curr Hypertens Rev,2015,11(2):132-142.
- [10] Fu JL,Shi Q,Song XF,et al. Tetrachlorobenzoquinone exhibits neurotoxicity by inducing inflammatory responses through ROS-mediated IKK/IκB/NF-κB signaling[J]. Environ Toxicol Pharmacol,2016,41:241-250.
- [11] 吴建利,李家富,冯 健.核因子-κB 在心室重构中的研究进展[J].心血管病学进展,2015,36(6):756-759.
- [12] Yeung F,Hoberg JE,Ramsey CS,et al. Modulation of NF-κB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase[J]. EMBO J,2004,23(12):2369-2380.
- [13] 易 蕙,袁海汀,许永会,等. NF-κB 抑制剂 PDTC 对人骨髓瘤 U266 细胞增殖和凋亡的影响[J].中国病理生理杂志,2017,33(7):1177-1183.
- [14] Nguyen PA,Won JS,Rahman MK,et al. Modulation of Sirt1/NF-κB interaction of evogliptin is attributed to inhibition of vascular inflammatory response leading to attenuation of atherosclerotic plaque formation[J]. Biochem Pharmacol,2019,168:452-464.
- [15] Abedimanesh N,Motlagh B,Abedimanesh S,et al. Effects of crocin and saffron aqueous extract on gene expression of SIRT1,AMPK,LOX1,NF-κB, and MCP-1 in patients with coronary artery disease:a randomized placebo-controlled clinical trial[J]. Phytother Res,2020,34(5):1114-1122.

(责任编辑:冉明会)