

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.22.016

白藜芦醇对模型大鼠心肌梗死后心力衰竭的改善作用*

熊剑涛¹, 张春龙², 张诗锐¹, 郭 琴¹, 周承毅^{1△}, 孙 娟³

(1. 湖北省恩施华龙总医院急诊医学科, 湖北 恩施 445000; 2. 湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院重症医学科, 湖北 恩施 445000; 3. 湖北民族大学医学部, 湖北 恩施 445000)

摘要:目的 探讨白藜芦醇对模型大鼠心肌梗死后心力衰竭(HFMI)的改善作用。方法 将 40 只 SD 大鼠随机分为假手术组(等体积 0.9% 氯化钠溶液)、模型组(等体积 0.9% 氯化钠溶液)、白藜芦醇组(30 mg/kg)和非诺贝特组(100 mg/kg), 各 10 只。手术结扎冠状动脉左前降支, 复制 HFMI 大鼠模型。建模成功后, 分别予灌胃相应药物或 0.9% 氯化钠溶液, 每天 1 次, 持续 4 周。超声心动图检测大鼠左心室功能; 苏木素-伊红(HE)染色检测大鼠心肌结构变化; 采用酶联免疫吸附法检测大鼠血清中白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平; TUNEL 染色检测大鼠心肌细胞凋亡情况; Western blot 法检测 Toll 样受体 4 (TLR4)和核因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达水平。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠射血分数(EF)、缩短分数(FS)、SOD 水平均显著降低($P < 0.01$), 左室舒张末期径(LVEDd), 左室收缩末期径(LVESd)和 IL-6, TNF- α , MDA 水平, 心肌细胞凋亡率, TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 白藜芦醇组和非诺贝特组大鼠 EF, FS, SOD 水平均显著升高($P < 0.01$), LVEDs, LVESd 和 IL-6, TNF- α , MDA 水平, 心肌细胞凋亡率, TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$)。假手术组大鼠心肌细胞排列整齐, 模型组排列紊乱, 白藜芦醇组和非诺贝特组排列趋于整齐。结论 白藜芦醇可改善模型大鼠 HFMI 状态, 其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 通路有关。

关键词:白藜芦醇; 急性心肌梗死后心力衰竭; TLR4/NF- κ B 通路; 炎症因子; 细胞凋亡

中图分类号: R965; R972

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)22-0066-05

Improvement Effect of Resveratrol on Heart Failure Post-Myocardial Infarction in Model Rats

XIONG Jiantao¹, ZHANG Chunlong², ZHANG Shirui¹, GUO Qin¹, ZHOU Chengyi¹, SUN Juan³

(1. Department of Emergency Medicine, Enshi Hualong General Hospital, Enshi, Hubei, China 445000; 2. Department of Critical Care Medicine, The Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei, China 445000; 3. Department of Medicine, Hubei Minzu University, Enshi, Hubei, China 445000)

Abstract: Objective To investigate the improvement effect of resveratrol on heart failure post-myocardial infarction(HFMI) in model rats. **Methods** A total of 40 SD rats were randomly divided into the sham operation group(equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution), model group(equal volume of 0.9% Sodium Chloride Solution), resveratrol group(30 mg/kg of resveratrol) and fenofibrate group(100 mg/kg of fenofibrate), 10 rats in each group. The left anterior descending coronary artery of rats was ligated to replicate the HFMI rat model. After successful modeling, the rats were treated with intragastric administration of corresponding drugs or 0.9% Sodium Chloride Solution once a day for four weeks. The left cardiac function was detected by echocardiogram. The changes in myocardial structure were detected by hematoxylin-eosin(HE) staining. The levels of serum interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), superoxide dismutase(SOD) and malondialdehyde(MDA) were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The apoptosis of rat cardiomyocytes was detected by the TUNEL staining. The expression levels of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor- κ B(NF- κ B) protein were detected by Western blot. **Results** Compared with those in the sham operation group, the levels of ejection fraction (EF), fractional shortening(FS) and SOD in the model group decreased significantly($P < 0.01$), while the left ventricular end-diastolic diameter(LVEDd), left ventricular end-systolic diameter (LVESd), the levels of IL-6, TNF- α , MDA, the myocardial cell apoptosis rate, and the expression levels of TLR4 and NF- κ B protein in the model group increased significantly($P < 0.01$). Compared with those in the model group, the levels of EF, FS and SOD in the resveratrol group and the fenofibrate group increased significantly($P < 0.01$), while the LVEDd, LVESd, the levels of IL-6, TNF- α and MDA, the cardiomyocyte apoptosis rate, and the expression levels of TLR4 and NF- κ B protein in the resveratrol group and the fenofibrate group decreased significantly($P < 0.01$). The myocardial cells of rats in the sham operation group were arranged orderly, those in the model group were arranged disorderly, and the arrangement of the myocardial cells of rats in the resveratrol group and the fenofibrate group tended to be orderly. **Conclusion** Resveratrol can improve HFMI, and its mechanism may be related to the inhibition of the TLR4/NF- κ B pathway.

Key words: resveratrol; heart failure post-myocardial infarction; TLR4/NF- κ B pathway; inflammatory factors; apoptosis

*基金项目: 湖北省卫生健康委科研项目[WJ2019F068]。

第一作者: 熊剑涛, 男, 大学本科, 主治医师, 研究方向为危重疾病的临床治疗, (电子信箱) duanchenfor@163.com。

△通信作者: 周承毅, 男, 大学本科, 主治医师, 研究方向为危重疾病的临床治疗, (电子信箱) 396807153@qq.com。

近年来,心力衰竭(HF)的发生率逐渐升高。在美国,每年新增 HF 病例超过 500 万,其中死亡病例 27 万^[1]。目前,我国 HF 患者数已达 420 万,成人患病率超 0.9%^[2]。HF 是多种内外因素综合作用的结果,如心肌损伤或机械负荷过重会激活交感神经系统,引发多种细胞因子的产生。同时,心肌中的信号转导通路也会被激活,随后心肌细胞会发生一系列的病理变化,如心肌代偿性肥大^[3]。白藜芦醇(3,5,4'-三羟基二苯乙烯)属非黄酮类多酚化合物,具有抗癌、抗血管生成、免疫调节、心脏保护和抗氧化活性的药理学作用^[4]。白藜芦醇通过下调 Toll 样受体 4(TLR4)和核因子- κ B(NF- κ B)表达,减轻模型大鼠局灶性脑缺血后的炎症、血脑屏障破坏和脑损伤,对脑缺血模型大鼠发挥神经保护作用^[5];同时能改善糖尿病模型大鼠的心功能,抑制心肌细胞凋亡,参与改善线粒体功能^[6]。本研究中探讨了白藜芦醇通过 TLR4/NF- κ B 信号通路对模型大鼠急性心肌梗死后心力衰竭(HFMI)的改善作用,为白藜芦醇治疗 HF 提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

1.1.1 仪器

BX60 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);iMark680 型多功能酶标检测仪、凝胶成像系统、蛋白电泳仪(美国 Bio Rad 公司);MyLabTMSix 型彩色多普勒超声诊断仪(意大利 Esaote 公司);FrescoD-37520 型台式冷冻高速离心机(美国 Sorvall 公司);7500 型 PCR 仪(美国 ABI 公司);HWS28 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司)。

1.1.2 试剂

白藜芦醇(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号为 36227353,纯度 $\geq 99.9\%$);非诺贝特(法国利博福尼制药公司,批号为 H20181239);白细胞介素 6(IL-6)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(批号为 21423472)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)ELISA 试剂盒(批号为 2022848)、超氧化物歧化酶(SOD)ELISA 试剂盒(批号为 20672942)和丙二醛(MDA)ELISA 试剂盒(批号为 20790242),均购自上海纪宁实业有限公司;RIPA 裂解液(批号为 P0013B)、特超敏 ECL 化学发光试剂盒(批号为 P0018AS),均购自上海碧云天生物技术有限公司;TLR4, NF- κ B, GAPDH 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);HE 染色剂、辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(武汉三鹰生物技术有限公司);TUNEL 凋亡检测试剂盒(德国 Roche 公司,批号为 6432344001)。

1.1.3 动物

40 只 SD 大鼠,雄性,体质量(210 ± 20)g,购自湖北

民族大学动物实验中心,动物生产许可证号 SCXK(鄂)2019-0012。所有大鼠于鼠房适应环境,喂养 1 周。

1.2 方法

1.2.1 模型复制及分组、给药

将 40 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、白藜芦醇组和非诺贝特组,各 10 只。腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠,仰卧保定,气管插管,连接呼吸机、麻醉剂及心电监护仪。模型组、白藜芦醇组和非诺贝特组大鼠无创性线结扎冠状动脉左前降支,随后可见结扎线下方心肌颜色发白、心电图出现 S-T 改变及 Q 波,即为急性心肌梗死模型复制成功。假手术组大鼠仅穿线,不结扎。术后 2 周,大鼠射血分数(EF) $< 55\%$,即为 HF 模型复制成功^[7]。建模成功后,大鼠灌胃给药,白藜芦醇组予白藜芦醇(30 mg/kg)^[8],非诺贝特组予非诺贝特(100 mg/kg)^[9],假手术组和模型组予等体积 0.9% 氯化钠溶液。每天 1 次,持续 4 周。

1.2.2 左心室功能监测

末次给药 24 h 后,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉大鼠(下同),监测大鼠左室舒张末期内径(LVEDd)、左室收缩末期内径(LVESd)、左室舒张末期容积(LVEDV)、左室收缩末期容积(LVESV),并计算 EF、缩短分数(FS),至少连续监测 3 个心动周期。

1.2.3 心肌结构观察

麻醉大鼠,取出心脏,用 4% 多聚甲醛固定左室组织 72 h,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋、切片,常规二甲苯、乙醇脱蜡至水,苏木素(H)染色 10 min,0.7% 盐酸乙醇分化数秒,流水洗涤后,伊红(E)液浸染 3 min。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。于光学显微镜下放大 400 倍观察。

1.2.4 IL-6, TNF- α , SOD, MDA 水平检测

末次给药后,麻醉大鼠,尾静脉取血,1 000 g 离心 20 min,取血清,按 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中 IL-6, TNF- α , SOD, MDA 水平。

1.2.5 心肌细胞凋亡观察

取 1.2.3 项下心肌石蜡切片,常规脱蜡, PBS 漂洗,3% 过氧化氢浸洗 10 min,加入蛋白酶 K 工作液,37℃ 反应 20 min, PBS 漂洗后,滴加 TUNEL 反应混合液,37℃ 孵育 1 h。PBS 漂洗,加入转化剂,37℃ 孵育 20 min。PBS 漂洗, DAB 显色。中性树胶封片。于光学显微镜下放大 400 倍观察。

1.2.6 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达水平检测

按 1.2.3 项下方法进行心脏取材。把心脏组织剪切成细小碎片,以 RIPA 裂解液裂解组织,离心,取上清液, BCA 法测定蛋白含量。取 30 μ g 蛋白上样,10% SDS-PAGE 电泳后湿法电转至 PVDF 膜上,10% 脱脂

奶粉封闭,随后加入TLR4(1:3 000)抗体、NF- κ B(1:3 000)抗体和GAPDH(1:5 000)抗体,4℃孵育过夜。加入HRP标记二抗(1:5 000稀释)室温孵育1 h后,滴加BeyoECL Star工作液至膜上,化学发光成像仪检测。

1.3 统计学处理

采用SPSS 19.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,多组间比较行单因素方差分析,组间两两比较行LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 左室心功能

与假手术组比较,模型组大鼠EF和FS显著降低,

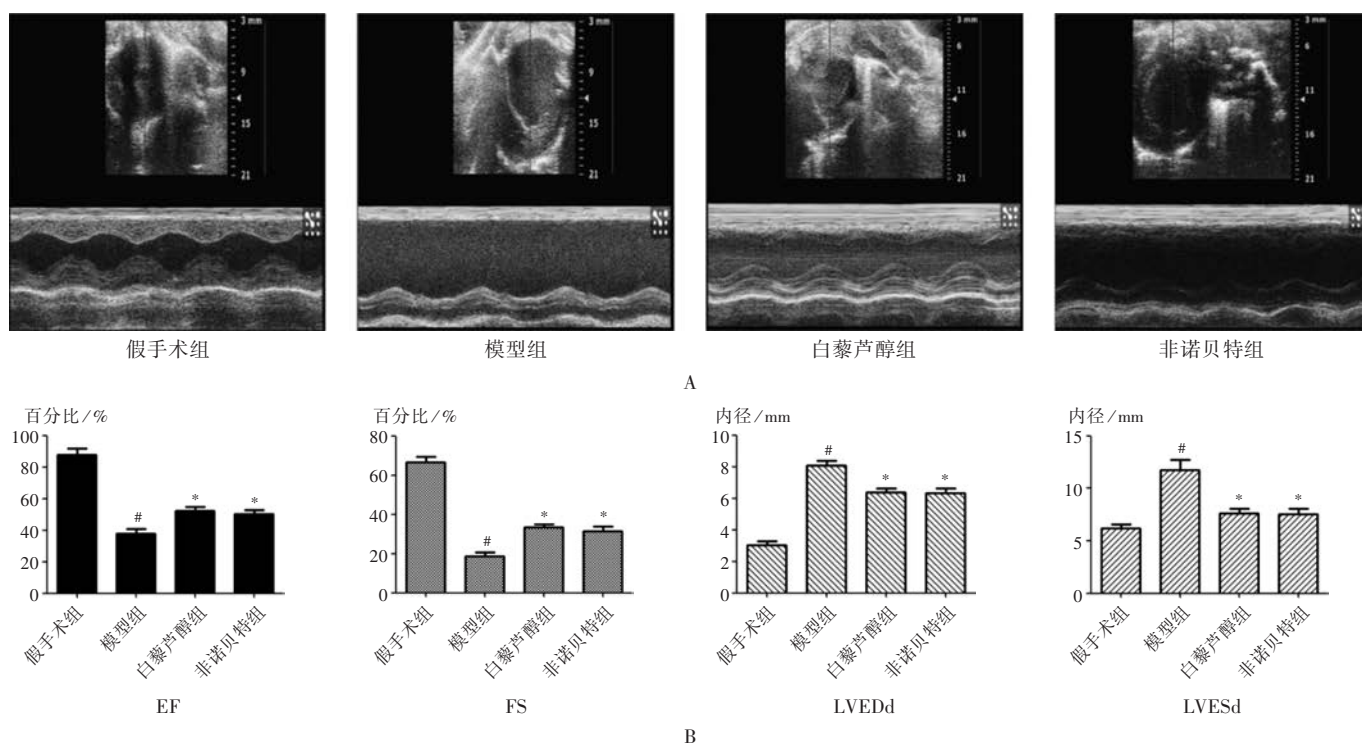
LVEDd和LVESd显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,白藜芦醇组和非诺贝特组大鼠的EF和FS显著升高,LVEDd和LVESd显著降低($P < 0.01$)。详见图1。

2.2 心肌结构

假手术组大鼠心肌细胞排列整齐,模型组大鼠心肌细胞肥大且排列紊乱,白藜芦醇组和非诺贝特组大鼠心肌细胞排列趋于整齐。详见图2。

2.3 炎症指标

与假手术组比较,模型组大鼠血清中IL-6和TNF- α 水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,白藜芦醇组和非诺贝特组大鼠血清IL-6和TNF- α 水



注:与假手术组比较, # $P < 0.01$;与模型组比较, * $P < 0.01$ 。图3至图6同。

A. 左室结构图(HE, $\times 400$) B. 心功能指标数据统计

图1 各组大鼠心功能比较

Note: Compared with those in the sham operation group, # $P < 0.01$; compared with those in the model group, * $P < 0.01$; as well as Fig. 3 to Fig. 6.

A. Left ventricular structure map(HE, $\times 400$) B. Data statistics of cardiac function indexes

Fig. 1 Comparison of cardiac function of rats in each group

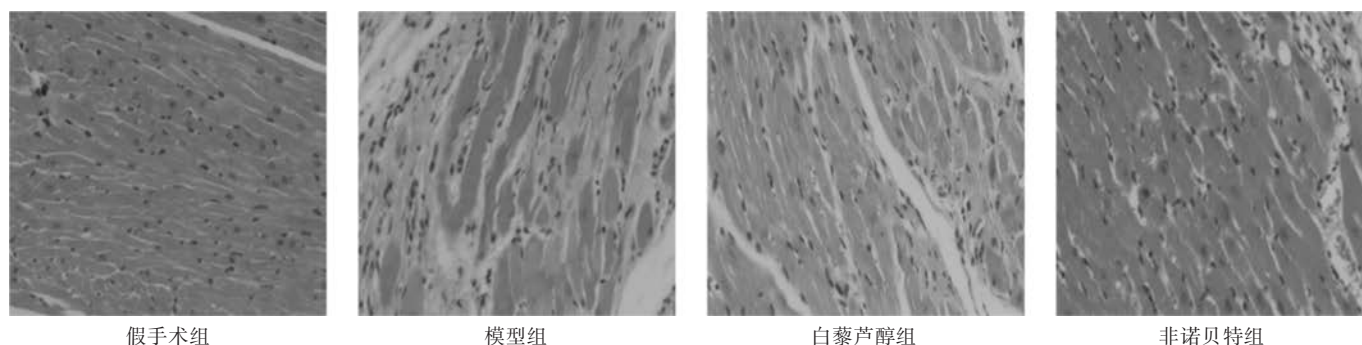


图2 各组大鼠心肌结构图(HE, $\times 400$)

Fig. 2 Myocardial structure map of rats in each group(HE, $\times 400$)

平显著降低 ($P < 0.01$)。详见图 3。

2.4 氧化应激指标

与假手术组比较,模型组大鼠血清中 SOD 水平显著降低,MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,白藜芦醇组和非诺贝特组 SOD 水平显著升高,MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$)。详见图 4。

2.5 心肌细胞凋亡情况

与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,白藜芦醇组和非诺贝特组大鼠心肌细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$)。详见图 5。

2.6 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达水平

与假手术组比较,模型组大鼠血清中 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,白藜芦醇组和非诺贝特组大鼠血清中 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。详见图 6。

3 讨论

HF 在老年患者中非常普遍,即使接受了最佳的药物治疗,但 5 年内死亡率仍很高^[10-11]。目前的药物治疗可预防新发性 HF 的发生,延缓 HF 的进展,但对多数接受治疗的患者来说,预后欠佳,出院后 90 d 内,再住院

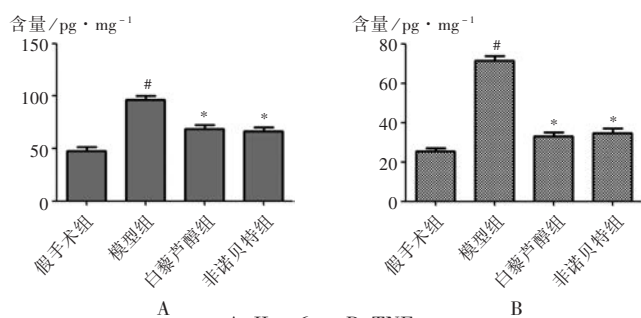


图 3 各组大鼠炎症指标比较

A. IL-6 B. TNF- α

Fig. 3 Comparison of inflammatory indexes of rats in each group

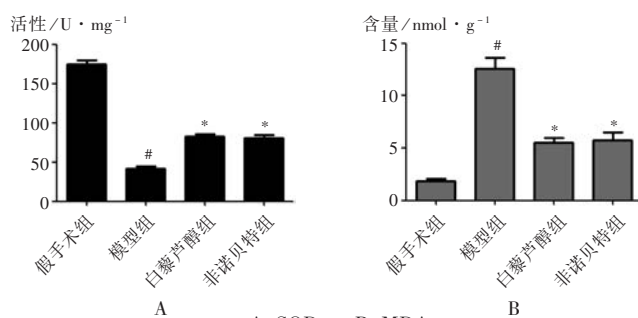
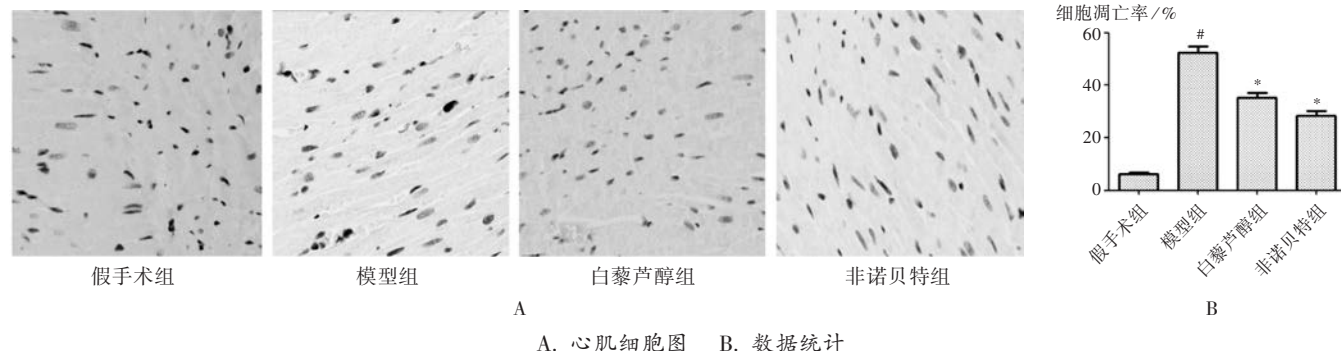


图 4 各组大鼠氧化应激指标比较

A. SOD B. MDA

Fig. 4 Comparison of oxidative stress indexes of rats in each group

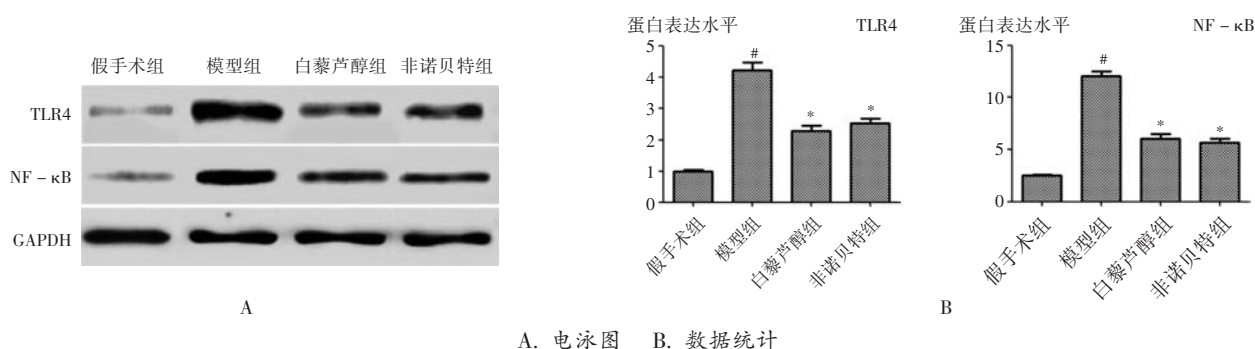


A. 心肌细胞图 B. 数据统计

图 5 各组大鼠心肌细胞凋亡情况

A. Cardiomyocyte map B. Data statistics

Fig. 5 Cardiomyocyte apoptosis of rats in each group



A. 电泳图 B. 数据统计

图 6 各组大鼠 TLR4 和 NF- κ B 蛋白表达水平

A. Electrophoretic map B. Data statistics

Fig. 6 The expression levels of TLR4 and NF- κ B protein of rats in each group

率高(35%)^[12]。

白藜芦醇能显著改善心肌梗死模型大鼠的 EF, 减少心肌梗死引起的左室重构和心房重构, 恢复脂肪酸氧化水平, 显著改善心肌能量代谢^[13-14]。此外, 白藜芦醇能显著抑制压力超负荷诱导的小鼠心肌肥厚、纤维化和心肌细胞凋亡, 改善模型小鼠心功能^[15]。本研究结果显示, 白藜芦醇可明显改善 HFMI 模型大鼠的心功能, 改善心肌结构。白藜芦醇还可抑制模型大鼠的心肌细胞凋亡。

氧化应激和炎症在多种疾病的进展中发挥着重要作用。研究表明, 白藜芦醇可改善糖尿病并 HF 模型大鼠的心血管功能, 显著抑制炎症因子和氧化应激标志物 MDA 的产生^[16]。白藜芦醇对高脂饮食引起的肾损伤具有保护作用, 提高肾脏抗氧化酶活性, 降低肾脏 MDA, TNF- α , IL-6 水平^[17]。本研究结果显示, 白藜芦醇可降低 HFMI 模型大鼠血清中 IL-6, TNF- α , SOD, MDA 水平, 从而发挥抗炎和抗氧化作用。

Toll 样受体属跨膜蛋白, 在先天免疫中起关键作用。NF- κ B 是调节生理过程、炎症反应和凋亡的重要转录因子。黄芪甲苷通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路而抑制心肌细胞凋亡^[18], 白藜芦醇通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路, 降低氧化应激和细胞凋亡, 在肾缺血再灌注损伤中发挥保护作用^[19]。本研究结果显示, 白藜芦醇可抑制 HFMI 模型大鼠 TLR4 和 NF- κ B 蛋白的表达水平。

综上所述, 白藜芦醇可改善模型大鼠 HFMI 状态, 其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 通路有关。

参考文献

- [1] MCLEOD G, SHUM K, GUPTA T, et al. Echocardiography in congenital heart disease[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2018, 61(5/6): 468-475.
- [2] LU Y, WANG P, ZHOU T, et al. Comparison of prevalence, awareness, treatment, and control of cardiovascular risk factors in China and the United States[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(3): e007462-e007478.
- [3] VELAZQUEZ EJ, MORROW DA, DEVORE AD, et al. Angiotensin-neprilysin inhibition in acute decompensated heart failure[J]. N Engl J Med, 2019, 380(6): 539-548.
- [4] MA DSL, TAN LTH, CHAN KG, et al. Resveratrol-potential antibacterial agent against foodborne pathogens[J]. Front Pharmacol, 2018, 9(4): 102-118.
- [5] LEI JR, TU XK, WANG Y, et al. Resveratrol downregulates the TLR4 signaling pathway to reduce brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(4): 3215-3221.
- [6] DIAO J, WEI J, YAN R, et al. Effects of resveratrol on regulation on UCP2 and cardiac function in diabetic rats[J]. J Physiol Biochem, 2019, 75(1): 39-51.
- [7] 张丽丽, 李雁, 李龙. 加味温胆汤对急性心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌能量代谢和超微结构的影响[J]. 中国中医急症, 2020, 29(2): 201-205.
- [8] GUAN P, SUN ZM, WANG N, et al. Resveratrol prevents chronic intermittent hypoxia-induced cardiac hypertrophy by targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Life Sci, 2019, 233(6): 116748-116757.
- [9] BUKHARI IA, ALMOTREFI AA, MOHAMED OY, et al. Protective effect of fenofibrate against ischemia-reperfusion-induced cardiac arrhythmias in isolated rat hearts[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2018, 32(2): 141-146.
- [10] PLITT GD, SPRING JT, MOULTON MJ, et al. Mechanisms, diagnosis, and treatment of heart failure with preserved ejection fraction and diastolic dysfunction[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2018, 16(8): 579-589.
- [11] UCHMANOWICZ I, KU NIERZ M, WLEKLIK M, et al. Frailty syndrome and rehospitalizations in elderly heart failure patients[J]. Aging Clin Exp Res, 2018, 30(6): 617-623.
- [12] DORSHEIMER L, ASSMUS B, RASPER T, et al. Association of mutations contributing to clonal hematopoiesis with prognosis in chronic ischemic heart failure[J]. JAMA Cardiol, 2019, 4(1): 25-33.
- [13] JARDIM FR, DE ROSSI FT, NASCIMENTO MX, et al. Resveratrol and brain mitochondria: a review[J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(3): 2085-2101.
- [14] MATSUMURA N, TAKAHARA S, MAAYAH ZH, et al. Resveratrol improves cardiac function and exercise performance in MI-induced heart failure through the inhibition of cardiotoxic HETE metabolites[J]. J Mol Cell Cardiol, 2018, 125(2): 162-173.
- [15] CHEN C, ZOU LX, LIN QY, et al. Resveratrol as a new inhibitor of immunoproteasome prevents PTEN degradation and attenuates cardiac hypertrophy after pressure overload[J]. Redox Biol, 2019, 20(4): 390-401.
- [16] YAN F, SUN X, XU C. Protective effects of resveratrol improve cardiovascular function in rats with diabetes[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2): 1728-1734.
- [17] CHENG K, SONG Z, CHEN Y, et al. Resveratrol protects against renal damage via attenuation of inflammation and oxidative stress in high-fat-diet-induced obese mice[J]. Inflammation, 2019, 42(3): 937-945.
- [18] ZHAO Y, LIU Z, ZHANG H. Astragaloside protects myocardial cells from apoptosis through suppression of the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2018, 15(2): 1505-1509.
- [19] LI J, LI L, WANG S, et al. Resveratrol alleviates inflammatory responses and oxidative stress in rat kidney ischemia-reperfusion injury and H₂O₂-induced NRK-52E cells via the Nrf2/TLR4/NF- κ B pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(4): 1677-1689.

(收稿日期: 2020-12-12; 修回日期: 2021-07-10)