论著

文章编号:1000-5404(2006)08-0772-03

过氧化体增殖物激活型受体-γ对肥厚心肌炎症反应调控作用的初步研究

王 咏,肖颖彬 (第三军医大学新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要: 目的 探讨压力负荷性心肌肥厚过程中过氧化体增殖物激活型受体-γ(PPAR-γ)配体-罗格列酮钠对肥厚心肌中炎性反应的影响。**方法** 采用腹主动脉缩窄法复制压力超负荷大鼠心肌肥厚模型。分组:对照组(C组)、假手术-生理盐水组(S^-组)、假手术-罗格列酮组(S^+组)、心肌肥厚-生理盐水组(H^-组)、心肌肥厚-罗格列酮组(H^+组)。罗格列酮组:于术后4周用罗格列酮钠生理盐水溶液(4 ml·kg^{-1}·d^{-1})腹腔注射1周;生理盐水组:于术后4周用生理盐水腹腔注射1周(1 ml·kg^{-1}·d^{-1})。术后5周测定心肌肥厚指数及血液动力学指标;放免法检测左心室肌肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、血小板活化因子(PAF),以及髓过氧化物酶(MPD)含量;逆转录聚合酶链反应法检测心肌中过氧化体增殖物激活型受体(PPAR-γ)mRNA的表达;EMSA法检测核因子-κB(NF-κB)活性。**结果** 术后5周手术组左心室心肌明显肥厚;心肌中TNF-α、PAF、MPD含量增高($P<0.01$);罗格列酮干预能显著降低肥厚心肌中TNF-α、PAF、MPD的含量($P<0.01$),但仍高于对照组水平($P<0.01$)。罗格列酮组PPAR-γmRNA的表达明显增高($P<0.01$)。心肌肥厚组NF-κB活性明显增强($P<0.01$),罗格列酮能减轻NF-κB的激活($P<0.01$)。**结论** 压力负荷增加引起心肌肥厚,肥厚心肌组织中NF-κB激活明显增强,TNF-α、PAF、MPD表达升高,这一明显增强的炎症反应能被PPAR-γ人工合成配体罗格列酮钠所抑制。

关键词: 心肌肥厚;罗格列酮;过氧化体增殖物激活型受体-γ;核因子-κB

中图法分类号: R392.1;R542.21;R977.15 **文献标识码**: A

Regulation of peroxisome proliferator activated receptors-γ on inflammatory reaction in left ventricular hypertrophic rats

WANG Yong, XIAO Ying-bin (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of rosiglitazone, an synthetic ligand of peroxisome proliferator activated receptor-γ(PPAR-γ) on the expression of proinflammatory factors in rats of myocardial hypertrophy. **Methods** The rat model of hypertrophy were established by coarctation of abdominal aorta in male SD rats, and the rats with myocardial hypertrophy were treated with rosiglitazone or physiological saline ($n=10$ for each therapy). Some rats underwent sham operation and were given rosiglitazone or physiological saline ($n=10$ for each therapy). Rosiglitazone at the dose of 4 mg·kg^{-1}·d^{-1} or saline of 1 ml·kg^{-1}·d^{-1} was given intraperitoneally for 1 week after postoperative 4 weeks. Another 9 rats served as control. Hemodynamics, ventricular hypertrophic index, TNF-α, PAF, MPD, PPAR-γ and NF-κB were detected in all rats at postoperative 5 week. **Results** Significant hypertrophy was found in the left ventricle in rats undergoing the coarctation of abdominal aorta. The myocardium level of TNF-α, PAF, MPD was higher in rats with myocardial hypertrophy than in rats undergoing sham operation at postoperative 5 weeks ($P<0.01$). NF-κB was activated in rats with myocardial hypertrophy. Rosiglitazone could decrease the activation of NF-κB, induce PPAR-γ mRNA expression and reduce the expression of the three proinflammatory factors in rats with myocardial hypertrophy ($P<0.01$). **Conclusion** Rosiglitazone, a synthesized ligand, may regulate inflammation through inducing PPAR-γ expression and then reducing NF-κB activation in myocardial hypertrophy caused by overpressure load.

Key words: myocardial hypertrophy; rosiglitazone; peroxisome proliferator activated receptors-γ; nuclear factor-κB

基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC.2005BB5277)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC.2005BB5277)

作者简介:王 咏(1973-),男,云南省昆明市人,博士,主治医师,讲师,主要从事先心病的外科治疗和体外循环的病理生理方面的研究,发表论文10余篇。电话:(023)66116188, E-mail:wy003236@hotmail.com.

收稿日期:2005-12-12;**修回日期**:2006-02-01

心肌肥厚不仅是心力衰竭前的一种适应性反应,而且是心肌缺血、心律失常、猝死等心血管疾病的独立危险因子[1]。Jiang 等[2]研究发现过氧化体增殖物激活型受体-γ(PPAR-γ)可以通过抑制 IL-6 、环氧合酶、内皮素 1、一氧化氮合酶、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、明胶酶、粘附分子等的表达,抑制炎性反应。本研究利用腹主动脉缩窄法建立大鼠心肌肥厚模型,并检测肥厚心肌中炎性物质的变化以及 PPARγ 的配体 - 罗格列酮的作用,初步探讨 PPARγ 在大鼠心肌肥厚中抗炎作用的机制。

1　材料与方法

1.1　建立大鼠腹主动脉缩窄压力负荷型心肌肥厚模型及假手术对照

实验动物系纯种雄性 SD 大鼠(50 只),体质量(220 ± 22.3)g,由第三军医大学实验动物中心提供,实验动物机构许可证号:SCXK(渝)2002002。戊巴比妥钠腹腔麻醉后(40 mg/kg),打开腹腔,距左肾动脉开口上方 5 mm 处置一 6 号针头(直径 0.6 mm) ,一号丝线结扎后拔出针头,使腹主动脉缩窄达 65% ~70%;术后常规抗感染 3 d,正常饲养 5 周。

动物分组:随机分成 5 组,每组 10 支。对照组(C 组)、假手术 - 生理盐水组(S^- 组)、假手术 - 罗格列酮组(S^+ 组)、心肌肥厚 - 生理盐水组(H^- 组)、心肌肥厚 - 罗格列酮组(H^+ 组)。罗格列酮组:于术后 4 周用罗格列酮钠生理盐水溶液 4 ml · kg^{-1} · d^{-1})腹腔注射 1 周;生理盐水组:于术后 4 周用生理盐水腹腔注射 1 周 1 ml · kg^{-1} · d^{-1})。罗格列酮钠由重庆太极药业提供,批号:渝 G0085。

1.2　测定血流动力学指标及留取心肌组织标本

各组动物在观察期满后,分离右颈动脉、静脉并插管,以 PowerLab 型 8 道生理记录仪(澳大利亚 ADInstruments 公司)记录心率、平均动脉压、左室舒张末压 及左心室压力上升、下降最大速率。随后立即开胸取出心脏,灌洗后分别称取左心室(包括室间隔) 、右心室湿重。以左心室湿重/ 体重和右心室湿重/ 体重,分别代表左、右心室心肌的重量指数。取左心室心肌冻存于液氮中。

1.3　测定心肌中 TNF-α、PAF 含量

用放射免疫法测定各组心肌组织中 TNF-α、PAF 的含量。

检测 MPD 的含量:1 活性单位髓过氧化物酶定义为 25 ℃ 每分钟消耗的 1 μmol 的过氧化氢,结果以每克心肌组织髓过氧化物酶活性单位表示(髓过氧化物酶 U/g)。

1.4　RT-PCR 检测心肌 PPAR-γ mRNA 的表达

用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测心肌 PPAR-γ mRNA 的表达。用一步法(Tripure)提取心肌的总 RNA,测定其浓度。引物序列如下:正向: 5′-CTCACAATGCCATCAGGTTT-3′,反向: 5′-CTCTTGCACGGCTTCTACGG-3′,片段长度 359 bp ;内参照物为 β-actin 正向: 5′-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3′反向: 5′-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG- 3′,片段长度 764 bp,以上引物由上海生物技术工程公司提供。按照日本 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒说明书要求进行 RT-PCR 检测。

1.5　EMSA 检测心肌细胞核 NF-κB 的 DNA 结合活性

① 心肌细胞核蛋白提取: 取 0.1 g 实验大鼠心肌组织提取核蛋白,储存于 - 70 ℃。样品的蛋白浓度利用 Bradford 法测定, 达到 10 g/L 。② NF-κB 寡核苷酸探针的标记和纯化: NF-κB 寡核苷酸探针(上海生物技术工程公司)5′AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C 3′, 3′TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G 5′。用 γ^{32} P-ATP, 在 T4 多聚噬菌体多核苷酸激酶(10 U/μl)的作用下, 标记 NF-κB 寡核苷酸探针。标记后的探针用乙醇沉淀法醇化, - 20 ℃保存, 尽快用于 EMSA 测定 NF-κB 活性。③ EMSA 测定 NF-κB 活性: NF-κB 活性测定根据 EMSA 试剂盒操作(美国 PIERCE 公司)。

1.6　统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　各组大鼠血流动力学及心室重塑指标的变化详见表 1

表 1　大鼠血流动力学和心室重塑指标的改变($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	左室重量指数 (mg/ g)	右室重量指数 (mg/ g)	心率 (min^{-1})	左室舒张末压 (mmHg)	右室压力上升 最大速率(mmHg/s)	左室压力下降 最大速率(mmHg/ s)	平均动脉压 (mmHg)
C 组	9	2.36 ±1. 30	0.67 ±0.05	423 ±14	4. 2 ±0.6	5 765 ±279	4 442 ±201	119. 5 ±10.1
S^-组	10	2.36 ±1. 21	0.68 ±0.07	425 ±12	4. 2 ±0.8	5 833 ±319	4 378 ±121	118.0 ±14. 2
S^+组	10	2.30 ±1. 30	0.66 ±0.03	410 ±17	4.1 ±1. 1	5 743 ±122	4 315 ±139	120.0 ±20.6
H^-组	10	2.91 ±1. 23[a]	0.68 ±0.05	450 ±19[a]	10.3 ±1. 2 [a]	5 014 ±212[a]	3 895 ±209[a]	198.0 ±22.6[a]
H^+组	10	2.88 ±1. 10[a]	0.67 ±0.03	440 ±21[b]	9.1 ±1. 3[a]	5 333 ±128[a]	4 015 ±169[a]	178.0 ±16.2[a]

a: $P < 0.01$ 与 C 组比较;b: $P < 0.05$ 与 C 组比较

2.2　各组大鼠心肌组织中炎性因子的变化

C 组心肌组织中炎性因子含量较低;S 组心肌组织中炎性因子的含量也较低,且 S^+组心肌组织中炎性因子的含量较 S^-组有降低;H 组心肌组织中炎性因子含量明显增高,与 C 组相比有显著差异($P<0.01$);H^+组心肌组织中炎性因子含量低于 H^-组,但仍高于 C 组($P<0.01$);H^-组心肌组织中炎性因子含量明显高于 C 组($P<0.01$)。详见表 2。

表 2　各组心肌炎性物质的含量变化($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TNF-α 含量(pg/mg)	PAF 含量(ng/ml)	MPD 含量(μg/g)
C 组	9	125.61 ±6.22	8.87 ±1.11	15.49 ±2.06
S^-组	10	131.11 ±5.98	10.65 ±2.21	17.21 ±4.34
S^+组	10	110.34 ±3.76[ac]	6.78 ±4.65	10.33 ±2.18[bc]
H^-组	10	191.33 ±5.63[a]	17.32 ±1.13[a]	49.12 ±5.68[a]
H^+组	10	154.12 ±6.11[ad]	14.68 ±2.22[ae]	30.97 ±2.72[ad]

a:$P<0.01$ 与 c 组相比;b:$P<0.05$ 与 c 组相比;c:$P<0.01$ 与 S^-组相比;d:$P<0.01$ 与 H^-组相比,e:$P<0.05$ 与 H^-组相比

2.3 各组大鼠心肌组织中 PPAR-γ mRNA 表达的变化

C 组心肌组织 PPAR-γ mRN 表达量较低(0.21 ±0.05);S^- 组心肌组织 PPAR-γ mRN 表达也较低(0.31 ±0.15);S^+ 组心肌组织中 PPAR-γ mRN 表达有增高(0.48 ±0.07),与 C 组相比有显著差异($P<0.01$);H^+ 组心肌组织中 PPAR-γ mRN 表达明显高于 H^- 组(0.79 ±0.11)($P<0.01$),也高于 C 组($P<0.01$);H^- 组心肌组织中 PPAR-γ mRNA 量(0.44 ±0.08)明显高于对照组($P<0.01$)。

2.4 各组大鼠心肌细胞核 NF-κB 的 DNA 结合活性

C 组心肌细胞 NF-κB 的 DNA 结合活性较低(0.41 ±0.05),S 组(S^- 组、S^+ 组)(0.37 ±0.15, 0.31 ±0.09)心肌细胞 NF-κB 的 DNA 结合活性与 C 组相比无显著差异;H 组(H^- 组、H^+ 组)心肌细胞 NF-κB 的 DNA 结合活性明显高于 C 组($P<0.01$);H^+(1.39 ±0.11)组心肌细胞 NF-κB 的 DNA 结合活性明显低于 H-组(2.44 ±0.08)($P<0.01$)。

3 讨论

过氧化物酶体增殖物活化型受体是一类配体依赖的转录因子,属于核受体超家族。近年来有研究表明,PPAR-γ 在大鼠心肌组织中亦有表达[3],最近也有报道 PPAR-γ 在人类心脏组织尤其是心室有高表达[4]。高血压大鼠心肌肥厚时心肌中 TNF-α、IL-1β 的 mRNA 和蛋白质表达增加,当发展为心力衰竭时其表达进一步增加[5]。在体外培养的心肌细胞中加入 IL-1β 可以引起心肌细胞肥大,而且使心房钠尿肽(BNP)等心肌肥厚的标志基因表达增加[6]。核因子 κB,转录信号转导和激活因子是调节炎症反应重要转录因子,肿瘤坏死因子-α、IL-1β 等炎性细胞因子的基因转录都通过上述信号转导途径调控[7]。应用炎性细胞因子拮抗剂能延长压力负荷增加引起心衰的大鼠的生存时间[8]。

以罗格列酮为代表的噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂是 PPAR-γ 的特异性激活剂,新的研究表明这类药物有一定的抗炎作用,即通过对 NF-κB 的抑制以及增加诱导型一氧化氮合酶的机制发挥有效的抗炎作用[9]。动物实验显示吡格列酮能有效的抑制压力负荷增加引起的心肌肥厚,但具体机制尚不清楚[10]。Maggi 等[11]发现 15-脱氧前列腺素 J2 和曲格列酮等 PPAR-γ 配体能发挥强有力的抗炎作用,一方面抑制细胞因子诱导的炎症基因的表达,另一方面通过诱导热休克蛋白反应来阻断细胞因子信号转导。本实验采用不完全结扎大鼠腹主动脉的方法引起压力负荷增加造成心肌肥厚,并应用罗格列酮处理,结果显示:与单纯手术不用药的大鼠相比,用药组大鼠心肌中炎性因子 TNF-α、PAF、MPD 的表达均明显下降,左心室质量/体质量的比值也有明显降低。罗格列酮可能通过抑制 NF-κB 等炎症反应的信号转导途径抑制炎性细胞因子的表达,进而有效的抑制肥厚心肌中的炎症反应。有研究提示通过对炎症反应的抑制,不但可以抑制心肌肥厚的发展,还可以增强心肌对缺氧的耐受,减轻心肌缺氧-复氧损伤的程度[12]。这类药物能够增加胰岛素敏感性降低胰岛素抵抗,在临床上已经广泛用于糖尿病的治疗。对于这类药物的抗炎作用,以及缓解糖尿病性心脏病,心肌肥厚和心力衰竭并改善心脏功能作用方面的研究尚处在初级阶段。糖尿病常合并糖尿病性心肌病,引起左心室肥厚,噻唑烷二酮 作为治疗糖尿病的新药,对糖尿病合并左心室肥厚的患者,是否有一举两得的疗效,以及这一类药物能否用于心肌保护是心脏外科医师关心的问题,这一切都有待于进一步研究。

参考文献:

[1] LEVY D, GARRISON R J, SAVAGE D D, *et al*. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study[J]. N Engl J Med, 1990, 322(22): 1561 - 1566.

[2] JIANG C, TING A T, SEED B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines[J]. Nature, 1998, 391(6662): 82 - 86.

[3] TAKANO H, NAGAI T, ASAKAWA M, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha expression in neonatal rat cardiac myocytes[J]. Circ Res, 2000, 87(7): 596 - 602.

[4] MEHRABI M R, THALHAMMER T, HASLMAYER P, *et al*. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) is highly expressed in human heart ventricles[J]. Biomed Pharmacother, 2002, 56(8): 407 - 410.

[5] SHIOI T, MATSUMORI A, KIHARA Y, *et al*. Increased expression of interleukin-1 beta and monocyte chemotactic and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the hypertrophied and failing heart with pressure overload[J]. Circ Res, 1997, 81(5): 664 - 671.

[6] HARADA E, NAKAGAWA O, YOSHIMURA M, *et al*. Effect of interleukin-1 beta on cardiac hypertrophy and production of natriuretic peptides in rat cardiocyte culture[J]. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31(11): 1997 - 2006.

[7] ANCEY C, MENET E, CORBI P, *et al*. Human cardiomyocyte hypertrophy induced in vitro by gp130 stimulation[J]. Cardiovasc Res, 2003, 59(1): 78 - 85.

[8] SHIOI T, MATSUMORI A, KAKIO T, *et al*. Proinflammatory cytokine inhibitor prolongs the survival of rats with heart failure induced by pressure overload[J]. Jpn Circ J, 2001, 65(6): 584 - 585.

[9] CERNUDA-MOROLLON E, RODRIGUEZ-PASCUAL F, KLATT P, *et al*. PPAR agonists amplify iNOS expression while inhibiting NF-kappaB: implications for mesangial cell activation by cytokines[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(9): 2223 - 2231.

[10] ASAKAWA M, TAKANO H, NAGAI T, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy *in vitro* and *in vivo*[J]. Circulation, 2002, 105(10): 1240 - 1246.

[11] MAGGI L B, Jr., SADEGHI H, WEIGAND C, *et al*. Anti-inflammatory actions of 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 and troglitazone: evidence for heat shock-dependent and -independent inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression[J]. Diabetes, 2000, 49(3): 346 - 355.

[12] CUZZOCREA S. Peroxisome proliferator-activated receptors gamma ligands and ischemia and reperfusion injury[J]. Vascul Pharmacol, 2004, 41(6): 187 - 195.

(编辑 栗 嘉)