论著

文章编号:1000-5404(2006)18-1840-03

过氧化物酶体增殖激素型受体对AngⅡ诱导肥厚心肌细胞的影响

杨永曜[1],李隆贵[1],吴 强[2],胡 琴[3],耿昭华[1] ([1]第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管内科中心,重庆 400037;[2]贵州省人民医院心血管内科,贵阳 550002;[3]贵阳医学院附属医院心血管内科,贵阳 550001)

提 要:目的 探讨同时激活PPARα、PPARs激活剂对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导肥大心肌细胞的影响。**方法** 体外原代培养新生大鼠心肌细胞,分别以不同浓度非诺贝特(PPARα激活剂)和或吡格列酮(PPARγ激活剂)预处理24 h后,加用AngⅡ刺激诱导肥大心肌细胞模型。采用软件分析细胞表面积,以MTT比色法测定心肌细胞活力,用RT-PCR法检测α-MHC和胚胎基因β-MHC mRNA的表达。**结果** 与对照组相比,非诺贝特、吡格列酮显著逆转了AngⅡ诱导的心肌细胞肥大,抑制AngⅡ引起细胞活力改变,增加α-MHC mRNA表达,降低β-MHC mRNA的表达,α/β-MHC mRNA比值明显增加;相对两药处理组,上述指标与两药合用组无显著差异($P>0.05$)。**结论** PPARs信号通路激活能有效预防心肌细胞肥大,PPARαγ配体合用未见明显叠加效应。

关键词: 过氧化物酶体增殖物活化型受体;非诺贝特;吡格列酮;心肌肥大
中图法分类号: R322.11;R392.11;R542.202 **文献标识码:** A

Activators of peroxisome proliferator-activated receptors inhibit cultured AngⅡ-induced hypertrophic cardiomyocyte from neonatal rats

YANG Yong-yao[1], LI Long-gui[1], WU Qiang[2], HU Qin[3], GENG Zhao-hua[1] ([1]Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Cardiology, People's Hospital of Guizhou Province, Quiyang 550002; [3]Department of Cardiology, Affiliated Hospital to Quiyang Medical College, Quiyang 550001, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effects of the ligands of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), fenofibrate (PPARα activator) and pioglitazone (PPARγ activator) on the angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ)-induced cardiac hypertrophy *in vitro*. **Methods** A model of hypertrophy of neonatal rat cardiac myocytes was established with AngII stimulation. With the aid of Leca Qwin Image software, the surface area of cardiac myocytes was analyzed. The mRNA expression of α-MHC, β-MHC was measured by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the cultured myocyte viability was estimated by MTT assay. **Results** Fenofibrate or pioglitazone pretreatment 24 h prior to Ang Ⅱ stimulation, significantly reduced the cardiac hypertrophy ($P<0.01-0.05$), increased the expression of α/β-MHC mRNA, and inhibited the effect of Ang II on the cardiac myocyte viability in a dose-dependent manner. There were no significant differences in the above mentioned indices between fenofibrate and pioglitazone group. **Conclusion** Activating PPARs-dependent pathway prevents the cardiac hypertrophy, and there is no obvious additive effect when the 2 drugs are used in combination.

Key words: peroxisome proliferator-activated receptors; fenofibrate; pioglitazone; cardiac hypertrophy

过氧化物酶体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator activated receptors, PPARs)是一类由配体激活的核转录因子,属核受体超家族成员之一。已知有3种亚型:PPARα、PPARβ(也称PPARδ)和PPARγ,在心血管有广泛分布,具有多种生物学效应,可促进脂肪细胞分化和脂肪生成,增强机体对胰岛素的敏感性,调节体内糖平衡,抑制炎症因子生成及炎症形成,影响肿瘤生长等[1]。研究表明[2],心肌肥厚时PPARα活性被抑制,导致心肌脂质及能量代谢紊乱。本实验旨在研究PPARα、γ激活剂非诺贝特、吡格列酮对体外原代培养,血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)诱导肥大的新生大鼠心肌细胞表面积,心肌细胞活力,α、β-肌球蛋白重链(α、β-MHC)的影响,以探讨此类药物在心室重构心肌细胞肥大发生、发展中的作用。

基金项目: 贵州省科技攻关项目(2004NGY043)
Supported by the Key Sci & Tech Research Project of Guizhou Province (2004NGY043)
作者简介: 杨永曜(1975-),男,贵州省大方县人,博士研究生,医师,主要从事心肌病心力衰竭方面的研究。电话:13640537519
通讯作者: 李隆贵,电话:(023)68755135, E-mail: lgli602@hotmail.com
收稿日期: 2005-10-11;**修回日期:** 2005-12-29

1　材料与方法

1.1　动物

Wistar 乳鼠 20 只(1～3 d)，第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。

1.2　主要试剂及仪器

M199 培养基(Hyclone 公司)；D-Hanks 液(Sigma 公司)；胎牛血清(PAA 公司)；0.2% 胰酶(Sigma 公司)；0.06% Ⅱ型胶原酶(Amersco 公司)；鼠抗人 α 横纹肌 actin 克隆抗体(北京中山公司)；SABC2Cy3 免疫荧光试剂盒(博士德公司)；AngⅡ(Sigma)；非诺贝特(河南开封制药厂)用 DMSO 配成 1 mol/L 储液；吡格列酮(北京太洋药业)用 DMSO 配成 1 mol/L 储液；MTT(Amresco 公司)；Tripure(Roche 公司)；RT-PCR 两步法试剂盒(TaKaRa)。Model-550 型酶标仪(Bio-Rad 公司)；高速冷冻离心机(Heraeus Labofuge 400)；PCR 仪扩增仪；ChemiImager™5500 型凝胶成像仪；Leca 图像分析处理系统。

1.3　引物

见表 1。

表 1　α-MHC、β-MHC、β-actin 引物序列及扩增长度

扩增基因	引物序列	产物大小(bp)	退火温度(℃)
α-MHC	5′-ACCAA/GCAGC/CACGC/CAGTA-3′	440	54
	5′-TCCAG/CCAGC/CCAAG/ATGTT-3′		
β-MHC	5′-AGGAA/GAACC/TACTG/CGACT/G-3′	264	54
	5′-CATCC/TTAGG/GTTGG/GTAGC/AC-3′		
β-actin	5′-TTGTC/ACCAA/CTGGG/ACGAT/ATGG-3′	764	54
	5′-GATCT/TGATC/TTCAT/GGTGC/TAGG-3′		

1.4　实验方法

1.4.1　原代心肌细胞培养及鉴定　　取出乳鼠，无菌摘出心脏，通过分步消化和差速贴壁的方法分离纯化心肌细胞，用含 20% 胎牛血清的 M199 培养基培养，用抗横纹肌 α-actin 抗体通过免疫荧光染色鉴定。

1.4.2　心肌细胞的处理及分组　　心肌细胞培养 48 h 后换液，加入 AngⅡ(终浓度 10^{-7} mmol/L)刺激 24 h 建立心肌细胞肥厚模型。按预处理方式分为对照组，单纯非诺贝特(5、10、20 μmol/L)和/或吡格列酮刺激组(5、10、20 μmol/L)，模型组，AngⅡ刺激前 24 h 加不同浓度非诺贝特(5、10、20 μmol/L)和/或吡格列酮(5、10、20 μmol/L)，刺激因素作用 48 h 后收集细胞，进行指标检测。

1.4.3　心肌细胞表面积测定　　参考 Morissette 等[3]的方法，收获细胞后 Leca 图像处理系统 400×摄像，每组随机选取 3 次实验的 7 个视野，测量 100 个细胞面积，Leca Qwin 图像分析软件分析结果。

1.4.4　MTT 比色实验　　调整心肌细胞至 2×10^4/ml，接种于 96 孔板，按上述分组，培养结束前 4 h 每孔加入 MTT(5 g/L) 10 μl，培养结束后，弃上清液，每孔加入 150 μl 二甲亚砜(DMSO)，轻轻振荡 10 min，酶标仪测 570 nm 处吸光度值[D(570)]，每孔 D(570)值减去空白孔 D(570)值为测试孔 D(570)真值。

1.4.5　RT-PCR 扩增目的基因　　以 Tripure 试剂提取细胞总 RNA。按照 RT-PCR 试剂盒说明书操作。PCR 扩增条件为：94 ℃ 2 min 预变性，94 ℃ 30 s、54 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min，40 个循环后，72 ℃ 10 min 延伸。PCR 产物 5 μl 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像仪扫描，用 Quantity One- v4.4 软件进行分析，结果以与相应内参 β-actin 光密度值比值表示。

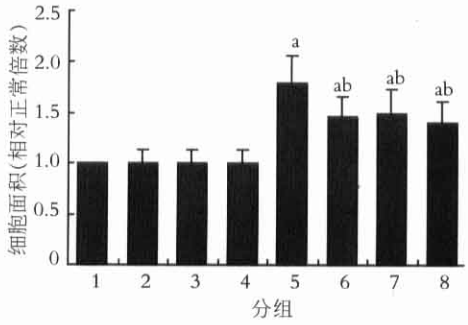
1.5　统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 12.0 统计软件，各组之间的差异用单因素方差分析，各组多重比较用 Dunnett 或 Dunnetts T3 法检验。

2　结果

2.1　PPARα、γ 配体对肥大心肌细胞表面积的影响

细胞培养 48 h 后免疫荧光显示 90% 以上的细胞表达 α-actin，呈细丝束状分布，提示培养细胞为心肌细胞，纯度达到要求。如图 1 所示，AngⅡ诱导了心肌细胞肥大，表面积较正常组显著增加；非诺贝特、吡格列酮在终浓度为 10 μmol/L 时可明显逆转此变化，两者合用无叠加效应($P>0.05$)。对正常心肌细胞非诺贝特、吡格列酮无明显影响。

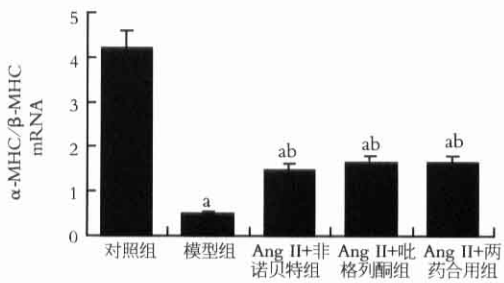


a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与模型组比较；1：对照组；2：单纯非诺贝特刺激组；3：单纯吡格列酮刺激组；4：单纯两药合用刺激组；5：模型组；6：AngⅡ＋非诺贝特组；7：AngⅡ＋吡格列酮组；8：AngⅡ＋两药合用组

图 1　PPARα、γ 配体对 Ang Ⅱ作用细胞表面积的影响(每组 100 个细胞)

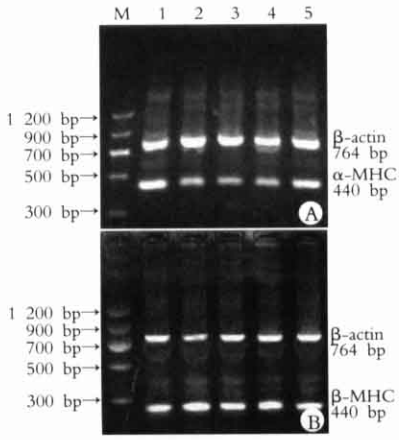
2.2　PPARα、γ 配体对肥大心肌细胞 α-MHC、β-MHC-mRNA 的影响

PCR 扩增结果显示：AnⅡ诱导心肌细胞肥大的同时，明显降低了 α-MHC mRNA 的表达，增加了 β-MHC mRNA，α/β-MHC mRNA 表达比值明显增加；非诺贝特、吡格列酮加入 AngⅡ刺激前 24 h 加入可明显逆转此变化，并呈一定浓度依赖性，两者合用无叠加效应($P>0.05$)，见图 2、3。对正常心肌细胞两药则无明显影响(结果略)。



a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与模型组比较

图 2　PPARα、γ 配体中等剂量对肥大心肌细胞 α-MHC/β-MHC mRNA 的影响($n=6$)



M：PCR 标准；1：对照组；2：Ang Ⅱ；3：Ang Ⅱ + 非诺贝特；4：Ang Ⅱ + 吡格列酮；5：Ang Ⅱ + 两药合用组

图3 各组 α-MHC mRNA（A）、β-MHC mRNA（B）RT-PCR 产物的电泳图谱

2.3 PPARα、γ 配体对肥大心肌细胞细胞活力的影响

与正常心肌细胞相比，Ang Ⅱ诱导心肌细胞肥大的同时也显著改变了心肌细胞活力，非诺贝特、吡格列酮可有效抑制 Ang Ⅱ引起的细胞活力改变，并呈一定浓度依赖性，两者合用无叠加效应（$P>0.05$），对正常心肌细胞两药则无明显影响（表2）。

表2 PPARα、γ 配体对肥大心肌细胞细胞活力的影响[D(570)/孔]

浓度	吡格列酮		非诺贝特		两药合用	
(μmol/L)	对照组	模型组	对照组	模型组	对照组	模型组
0	0.227±0.027	0.324±0.02[b]	0.227±0.027	0.324±0.020[b]	0.227±0.027	0.324±0.020[b]
5	0.246±0.017	0.307±0.04[a]	0.232±0.029	0.315±0.025[a]	0.243±0.023	0.271±0.014[ac]
10	0.237±0.023	0.250±0.03[c]	0.235±0.016	0.274±0.018[c]	0.246±0.010	0.245±0.016[d]
20	0.239±0.022	0.244±0.01[d]	0.227±0.025	0.248±0.010[d]	0.230±0.006	0.234±0.014[d]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与 0 μmol/L 模型组比较

3 讨论

心肌细胞肥大是导致心肌重构并逐渐形成心力衰竭的病理基础，也是心脏猝死和其他心脏事件的独立危险因子，Kanda 等[4]证实在肥厚心肌中 PPAR/RXR 活性明显下调到胚胎水平。现已确定肾素-血管紧张素-醛固酮系统（RAAS）在失代偿心力衰竭时显著激活，血管紧张素Ⅱ（AngⅡ）是促进心室重构的重要因子。而近来因 PPARγ 选择性激动剂会导致肥胖、水肿等不良副作用，PPARα 选择性激动剂则用于降血脂，恰好可减少该类副作用，因此 PPARγ 和 PPARα 的双重激动剂开始受到重视[5]。本研究选用临床上常用的 PPARα、γ 配体非诺贝特和吡格列酮及两者联用作用于 AngⅡ诱导的体外肥大心肌细胞，以探讨 PPARα、γ 同时激活在心肌肥大发生发展中的重要作用。

本研究显示，非诺贝特、吡格列酮预处理 24 h，可明显逆转 Ang Ⅱ诱导的心肌细胞表面积、心肌细胞 α/β-MHC mRNA 表达比值及心肌细胞活力的改变，并呈一定剂量依赖性；目前已了解肥大心肌中晚期可再表达心钠肽（ANP）、脑钠肽（BNP）和 β-肌球蛋白重链（β-MHC）等胚胎基因[6]，说明肥厚心肌重新激活了胚胎时期相关基因的转录模式，也表明了本研究心肌细胞肥厚模型建立的可靠性。本研究表明非诺贝特、吡格列酮有效抑制了 Ang Ⅱ对心肌细胞活力和增殖力的影响，可能使心肌氧耗减少，加强代偿作用，更进一步支持 PPARs 信号通路介入了心肌细胞的能量代谢。虽然本研究显示两药合用有叠加效应趋势，但无统计差异，这一点少见报道，有待更多实验明确。PPARs 与 RAAS 系统的相互影响机制尚不明了，Shimamoto 等[7]在 HeLa 细胞上通过对 PPARα 配体苯扎贝特和其竞争性抑制剂肝细胞核因子（HNF-4）对人血管紧张素（Ang）启动子-1222 至 +44 序列结合研究发现 bezafibrate 对 Ang 的结合可被 HNF-4 抑制。先前 Sugawara 等[8]证实了 PPARγ 配体 15-d-PGJ2 可通过在转录水平对转录因子 Sp1 的影响，抑制 AT1R 基因的表达，使 Ang Ⅱ效应下降，抑制了血管平滑肌细胞增殖肥大和血管的收缩。故考虑它们之间可能通过其他转录因子或两者直接相互作用有关，需进一步实验研究证实。总之，PPARα、γ 配体除了治疗高脂血症、糖尿病外，经长时间预处理可显著抑制 Ang Ⅱ诱导的心肌细胞肥大及不利作用，随着对其机制研究的不断深入，可能为今后心血管病的防治带来新的途径和希望。

参考文献：

[1] BORDJI K, GRILLASCA J P, GOUZE J N, *et al*. Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma? and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes [J]. J Biol Chem, 2000, 275(16): 12243-12250.

[2] 胡 琴，李隆贵，耿昭华，等. 大鼠肥厚心肌能量代谢胚胎型转换的分子机制及卡维地洛的作用[J]. 第三军医大学学报，2003，25(16)：1438-1440.

[3] MORISSETTE M R, HOWES A L, ZHANG T, *et al*. Upregulation of GLUT1 expression is necessary for hypertrophy and survival of neonatal rat cardiomyocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35(10): 1217-1227.

[4] KANDA H, NOHARA R, HASEGAWA K, *et al*. A nuclear complex containing PPARalpha/RXRalpha is markedly downregulated in the hypertrophied rat left ventricular myocardium with normal systolic function[J]. Heart Vessels, 2000, 15(4): 191-196.

[5] SHEARER B G, HOEKSTRA W J. Recent advances in peroxisome proliferator-activated receptor science[J]. Curr Med Chem, 2003, 10(4): 267-280.

[6] HARADA M, ITOH H, NAKAGAWA O, *et al*. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes[J]. Circulation, 1997, 96(10): 3737-3744.

[7] SHIMAMOTO Y, HIROTA K, FUKAMIZU A. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor alpha on human angiotensinogen promoter[J]. Int J Mol Med, 2004, 13(5): 729-733.

[8] SUGAWARA A, TAKEUCHI K, URUNO A, *et al*. Transcriptional suppression of type 1 angiotensin II receptor gene expression by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells[J]. Endocrinology, 2001, 142(7): 3125-3134.

（编辑 周 芳）