基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1670-03

厄贝沙坦对大鼠梗死心肌 PPAR-γ 表达及心室重塑的影响

刘 俊,覃 数,杨 义,何 泉
(重庆医科大学附属第一医院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:检测过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptor γ,PPAR-γ)在大鼠心肌梗死时心肌细胞中的表达水平,探讨厄贝沙坦逆转心室重塑的机制是否与 PPAR-γ 有关。方法:结扎大鼠冠状动脉前降支建立心肌梗死模型,24 h 后存活大鼠随机分成心肌梗死(Myocardial infarction,MI)组、厄贝沙坦(Irbesartan,Ire)组 75 mg/(kg·d),另设假手术(Sham)组。6 周后测定 PPAR-γ mRNA 及蛋白的表达情况,左室重量指数,心肌细胞横切面积,测定心肌胶原容积分数。结果:与假手术组比较,MI 组大鼠心肌中 PPAR-γ mRNA 及蛋白表达水平显著降低,左室重量指数增加,心肌细胞横截面积增加,非梗死区胶原沉积明显,胶原比例增加。Ire 组心肌中 PPAR-γ mRNA 及蛋白表达水平增高,左室重量指数降低,心肌细胞横截面积减少,非梗死区胶原沉积减少。结论:PPAR-γ 在大鼠心肌梗死时心肌细胞中的表达下调;厄贝沙坦可能通过上调并激活 PPAR-γ 逆转心肌梗死后左室重塑。

【关键词】过氧化物酶体增殖物激活受体;心肌梗死;厄贝沙坦;心室重塑
【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-04

Effect of irbesartan on the expression of PPAR-γ and ventricular remodeling in rats with myocardial infarction

LIU Jun, et al
(*Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the expreesion of PPAR-γ in the left ventricular myocardium in rats with myocardial infarction, and to investiagate whether the mechanism of Irbesartan reversing the ventricular remodeling is related to PPAR-γ. *Methods*: Myocardial infarction models were successfully induced by ligation of anterior descending coronary artery.24 h later the survivors were randomly divided into 3 groups.① MI group;② Irbesartan group 75 mg/(kg·d);③ The rats with sham ligation formed Sham group.After 6 weeks, the expreesion of PPAR-γ, the ratio of LV weight to body weight (LVWI), cross-section area (CSA)of left ventricular myocardium were examined.The collagen volume fraction (CVF) were analyzed by PSR dyeing. *Results*: In MI group, compared with those in Sham group, the expreesion of PPAR-γ mRNA and protein in the left ventricular myocardium decraced significantly, but the LVWI, CSA and the CVF in non-infarcted zone increased.Compared with those in MI group, in Ire group, the expreesion of PPAR-γ mRNA and protein in cadiocyte incraced, while the LVWI、CSA and the CVF in non-infarcted zone decreased. *Conculusion*: The expression of PPAR-γ is down-regulated in the left ventricular myocardium with myocardial infarction, Irbesartan reverses the left ventricular remodeling possibly by up-regulating and activating PPAR-γ.

【Key words】PPAR-γ; Myocardial infarction; Irbesartan; Ventricular remodeling

过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator-activated receptor γ,PPAR-γ)属于核受体超家族中过氧化物酶体增殖物激活受体家族成员,为配体依赖性转录因子。有报道[1-3]称 PPAR-γ 激动剂噻唑烷二酮类药物能抑制压力负荷大鼠心肌肥厚及间质增生,即能够逆转压力负荷大鼠心室重塑;厄贝沙坦选择性阻断血管紧张素Ⅱ受体 1,能够逆转心室重塑,Michael[4]称血管紧张素Ⅱ受体类药物能够诱导离体培养的脂肪细胞中 PPAR-γ 的活性并呈一定的浓度依赖性。推测厄贝沙坦也能诱导在体动物中 PPAR-γ 活性,从而改善心肌梗死后心室重塑。PPAR-γ 在心肌梗死后的表达变化,厄贝沙坦逆转心室重塑的作用是否与 PPAR-γ 有关未见文献报道。本实验检测 PPAR-γ 在心肌梗死大鼠模型心肌细胞中的表达,观察厄贝沙坦改善心肌梗死

作者介绍:刘 俊(1983-),女,硕士,
研究方向:慢性心衰的机制。
通讯作者:覃 数,男,教授,E-mail:Qinshu@21cn.com。

左室重塑，探讨厄贝沙坦逆转心室重塑的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠，体重 224～267 g（重庆医科大学实验动物中心），厄贝沙坦片（批号：1567，赛诺菲安万特公司），PT-PCR 扩增所用试剂如下：TRNzol（TIANGEN），逆转录试剂盒 FSK100（TOYOBO），TaqTM、DL 2 000 和 DNA marker（Takara），Western blotting 免疫印迹所用试剂如下：蛋白裂解液（碧云天），BCA 蛋白定量试剂盒（PIERCEN），PVDF 膜（Hybond），山羊抗大鼠 PPAR γ 抗体（Santa Cruz，SC-1984），生物素化兔抗山羊 IgG，ECL 显色试剂盒（碧云天）。

1.2 方法

1.2.1 模型制备与分组 10%水合氯醛 0.3 ml/kg 腹腔麻醉，气管插管，呼吸机辅助呼吸，开胸暴露心脏，于肺动脉圆锥与左心耳之间距主动脉根部 5 mm 处，结扎冠脉前降支，负压关胸。在相同部位只穿线不结扎，建立假手术组。术后 24 h 存活大鼠随机分为 3 组：①心肌梗死（Myocardial infarction，MI）组，（n=8）；②厄贝沙坦（Irbesartan，Ire）组，75 mg/（kg·d），n=9；③假手术（Sham）组，（n=7）。Ire 组均于术后 24 h 开始灌胃给药，连续 6 周；MI 组和 Sham 组每日以等量生理盐水灌胃，连续 6 周。

1.2.2 RT-PCR 扩增 按照 Trizol 说明书提取心肌细胞总 RNA，紫外分光光度计 OD260 nm 定量，按照逆转录试剂盒 FSK100 取 2 μg 总 RNA 反转录为 cDNA。PPAR-γ 的扩增引物序列为：上游引物 5'-ACCCTTTACCACGGTTGATTTCTC-3'，下游引物 5'-CAGGCTCTACTTTGATCG CACTTT-3'（扩增片段长度 109 bp）；内参照 G3PDH 的扩增引物序列为：上游引物 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'，下游引物 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'（扩增片段长度 450 bp）。PCR 反应条件为：94℃预变性 5 min，94℃ 变性 2 min，57℃ 复性 45 s，72℃ 延伸 45 s，总循环数 35。PCR 扩增结果经 2.0%琼脂糖凝胶电泳后，紫外光下以 Gel Doc2 000 型全自动凝胶成像分析系统（Bio-Rad 公司）定量分析特异性扩增条带的荧光强度值。

1.2.3 Western blotting 免疫印迹分析 按照说明书将大鼠左室非梗死区心肌细胞裂解后以二喹啉甲酸（BCA）检测法进行蛋白定量，12%SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳，每泳道上样量总蛋白 80 g，湿转法把聚丙烯酰胺凝胶中的蛋白质转移到 PCDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭、抗体孵育，ECL 显色，实验结果以 Gel Doc 2 000 型全自动凝胶成像分析系统（Bio-Rad 公司）定量分析特异性蛋白条带的灰度值。

1.2.4 心脏重量及重量指数 10%水合氯醛 0.3 ml/kg 腹腔麻醉大鼠后开胸取出心脏，去除双侧心房及根部血管，分离左右心室，滤纸吸干后称取左室重量（包含室间隔），计算左心室重量与体重之比即为左室重量指数（Left ventricular weight index，LVWI）。

1.2.5 心肌细胞横截面积（Cross-section area，CSA）的测量 在长轴中点处垂直将左心室一分为二，心尖半石蜡包埋，4 μm 厚切片行苏木素一伊红染色。采用 Image pro plus 6.0 图象分析系统，用 Izumiya 等描述的方法，高倍镜下经标准灰度值校正后，每一标本取 50 个胞核位于中央的心肌细胞，测量心肌细胞的横径和面积，取其均值作为该标本的所得值。

1.2.6 Ⅰ、Ⅲ型胶原容积分数（Collagen volume fraction，CVF）测定 每张苦味酸－天狼猩红染色切片在偏振光显微镜下，于非梗死区非血管区随机选择 4 个视野（×400），用上述系统计算每个视野中Ⅰ型（呈红色或黄色）、Ⅲ型（呈绿色）胶原组织所占面积百分比，取均数代表Ⅰ型、Ⅲ型 CVF。

1.2.7 统计学处理 数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，使用 SPSS10.0 统计软件包处理，多组间比较采用方差分析，测量 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物模型建立与心肌梗死面积

8 周后共存活大鼠 27 只，剔除 MI 面积 <30% 或 >55% 大鼠 3 只，获完整资料大鼠 24 只。MI 组、Ire 组、Sham 组，梗死面积差异无统计学意义（P>0.05）。

2.2 各组大鼠 LVWI 比较

如表 1 所示，与 Sham 组比较，MI 组 LVWI 明显增加（P<0.01），Ire 组较 MI 组 LVWI 明显降低（P<0.05）。

2.3 各组大鼠 CSA 比较

如表 1 所示，MI 组及 Ire 组均较 Sham 组 CSA明显增大（P<0.01），Ire 组较 MI 组 CSA 明显减小（P<0.01）。

2.4 各组大鼠心肌 CVF 比较

如表 1 所示，Ⅰ型 CVF：MI 组及 Ire 组均较 Sham 组明显增加（P<0.01），Ire 组较 MI 组明显降低（P<0.01）；Ⅲ型 CVF：MI 组及 Ire 组均较 Sham 组明显增加（P<0.01），Ire 组较 MI 组明显降低（P<0.05）。

2.5 各组大鼠 PPAR-γmRNA 表达水平变化

如表 2 所示，MI 组较 Sham 组 PPAR-γ mRNA 表达明显降低（P<0.01），Ire 组较 MI 组表达明显增高（P>0.01），Ire 组较 Sham 组表达略低但无统计学意义（P<0.05）。

2.6 各组大鼠 PPAR-γ 蛋白质表达水平变化

如表 2 所示，MI 组较 Sham 组 PPAR-γ 蛋白质表达水平

表 1 厄贝沙坦对 MI 大鼠心室重塑的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	n（只）	LVWI（×10⁻³）	CSA	Ⅰ型 CVF（×10⁻²）	Ⅲ型 CVF（×10⁻²）
心梗组	8	2.26±0.162[f]	90 018.55±21 767.126[f]	16.454±5.724[f]	6.75±1.582[f]
药物组	9	1.7±0.134[a]	48 955.47±8 408.257[bd]	7.79±2.064[bd]	5.3±2.040[ad]
假手术组	7	1.92±0.267	25 449.29±4 560.941	0.154±0.062	0.16±0.055

表 2 各组大鼠心肌中 PPAR-γmRNA 及蛋白表达变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n(只)	PPAR-γ mRNA 含量	PPAR-γ 蛋白含量
心梗组	8	0.278 ± 0.047^{f}	1.073 ± 0.189^{f}
药物组	9	1.340 ± 0.373^{b}	3.267 ± 0.189^{b}
假手术组	7	1.883 ± 1.433	3.132 ± 0.403

与 MI 组比 $^{a}P<0.05$;与 MI 组比 $^{b}P<0.01$;与假手术组比 $^{c}P<0.05$;与假手术组比 $^{d}P<0.01$;MI 组与假手术组比 $^{e}P<0.01$;MI 组与假手术组比 $^{f}P<0.01$

明显降低($P<0.01$),Ire 组较 MI 组表达水平明显增高($P>0.01$),Ire 组较 Sham 组表达水平增高但无统计学意义($P<0.05$)。

3 讨 论

本实验发现,大鼠心肌梗死后 PPAR-γmRNA 表达均下调。雷健等[5]报道的 PPAR-γ 在阿奇霉素致心力衰竭大鼠左室心肌中 mRNA 表达下调。动物模型不同,但结果一致,提示其机制具有复杂性。可能与炎症、氧化应激及局部肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活有关[6]。本实验发现,心肌梗死后 PPAR-γ 蛋白表达亦下调,与 PPAR-γmRNA 表达一致。本实验发现,Ire 组 PPAR-γmRNA 及蛋白的表达均高于 MI 组。Michael 等[4]研究发现血管紧张素受体阻滞剂如厄贝沙坦能够诱导离体培养的脂肪细胞中 PPAR-γ 的活性并呈一定的浓度依赖性。表明厄贝沙坦于在体动物实验中亦能够激活 PPAR-γ,增加其表达。提示厄贝沙坦可能是 PPAR-γ 的激动剂之一。

本实验发现,MI 组 LVWI、CSA 及Ⅰ、Ⅲ型 CVF 均较 Sham 组增加,表明 MI 后左室发生重塑,存在心肌细胞肥大及间质胶原沉积。Ire 能够抑制心肌细胞肥大及胶原增生,降低心室重量和重量指数,这与 Bian 等[7]研究发现厄贝沙坦能能逆转心肌梗死后心室重塑的结果一致。Asakawa 等[8]发现 PPAR-γ 激动剂能抑制压力负荷诱导的动物模型的心脏体重比增加及心肌细胞直径增加,表明 PPARγ 激动剂能抑制心肌肥厚中,其作用依赖于 PPAR-γ。Henderson 等[9]发现 PPAR-γ 激动剂可通过下调 MMPs 的表达而减少压力负荷大鼠心肌胶原的合成。吴扬等[10]发现血管紧张素Ⅱ具有生长因子样作用,可直接促进心肌细胞 RNA 和蛋白质的合成,Yousef 等[11]发现血管紧张素Ⅱ还通过刺激心脏神经末梢释放去甲肾上腺素,刺激内皮细胞释放内皮素间接介导心肌细胞肥大,诱导成纤维细胞增殖、合成并分泌黏附分子及细胞外基质。表明厄贝沙坦可能通过激活 PPAR-γ 以及阻断血管紧张素Ⅱ受体共同作用与心肌细胞,改善心室重塑。

本研究表明心肌梗死大鼠心肌中 PPAR-γmRNA 及蛋白表达水平显著降低,厄贝沙坦干预后可明显改善大鼠心梗后心室重塑,该效应可能与 PPAR-γ 表达和活性上调有关。进一步认识这一机制,将会为血管紧张素受体阻断剂(Angiotensin riceptor blocker, ARB)类药物扩展临床适应症提供实验依据,并拓宽 PPAR-γ 激动剂在临床的使用范围。

参 考 文 献

[1] Sakai S, Miyauchi T, Irukayamato Mobey, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit endothelin-1-related cardiac hypertrophy in rats[J]. Clin Sci, 2002, 103(48 s): 16-20.

[2] 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(6): 1240-1246.

[3] 叶 平,张 铖,伍士敏,等.吡格列酮抑制大鼠心肌肥厚的实验研究[J].中国应用生理学杂志,2005,21(1):36-39.

[4] Michael S, Jurgen J, Ronald C, et al. Angiotensin type Ⅰ receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor-γ activity[J]. Circulation, 2004, 109(8): 2054-2057.

[5] 雷 健,狄 鸣,李佐民,等.过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 在阿霉素致心力衰竭大鼠左室心肌中表达与罗格列酮的干预作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(51):10260-10264.

[6] Tham D M, Martin M B, Wang Y X, et al. Angiotensin Ⅱ is associated with activation of -kappa β -mediated genes and downregulation of PPARs[J]. Physiol Genomics, 2002, 11(1): 21-30.

[7] Bian S Y, Liu H B, Yang T S, et al. Effect of irbesartan on late ventricular remodeling and entricular function after acute myocardial infarction[J]. Chin J Arterioscler, 2006, 14(8): 649-652.

[8] Asakawa M, Takano H, Nagai T, et al. Peroxisome proliferator-act -ivated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo[J]. Circulation, 2002, 105(6): 1240-1246.

[9] Henderson B C, Sen U, Reynolds C, et al. Reversal of systemic hypertension-associated cardiac remodeling in chronic pressure overload myocardium by ciglitazone[J]. Int J Biol Sci, 2007, 3(6): 385-392.

[10] 吴 扬,潘敬运.血管紧张素Ⅱ对培养新生大鼠心肌细胞 MHC 基因表达的影响[J].中国病理生理杂志,1998,14(2):126-194.

[11] Yousef Z R, Redwood S R, Marber M S. Postinfarction left ventricular remodeling where are the theories and trials leading us[J]. Heart, 2000, 83(1): 76-80.

(责任编辑:关蕴良)