维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0373－03

PPARγ 激动剂抑制 AngⅡ诱导乳鼠心肌细胞合成肿瘤坏死因子

汪华玲, 覃 数, 陈齐红

(重庆医科大学临床学院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究过氧化体增殖物激活型受体 γ(PPARγ)激动剂(罗格列酮)对血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)刺激乳鼠心肌细胞合成肿瘤坏死因子(TNF－α)的影响,旨在探讨罗格列酮作用于心肌细胞时,在细胞因子调节中发挥的作用。方法:采用酶消化和差速贴壁法分离乳鼠心肌细胞。罗格列酮预处理 30min 后,用 AngⅡ与乳鼠心肌细胞共同培养 24h,然后分别采用 ELISA 和 RT－PCR 法检测细胞培养上清液 TNF－α 含量和心肌细胞 TNF－αmRNA 表达水平。结果:AngⅡ刺激乳鼠心肌细胞 TNF－α 蛋白质合成和 mRNA 表达增加,罗格列酮抑制 AngⅡ的作用($P<0.01$),且在一定范围内,浓度越高作用越强。结论:罗格列酮抑制 AngⅡ刺激的乳鼠心肌细胞 TNF－αmRNA 表达和蛋白质合成,罗格列酮这一作用为治疗慢性心力衰竭提供了新的思路。

【关键词】过氧化体增殖物激活型受体 γ;TNF－α;AngⅡ;心肌细胞

【中国图书分类法分类号】R541 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－08－26

PPARγ activators inhibitory effects on angiotensinⅡ induced tumor necrosis factorα expression in neonatal rat cardiac myocytes

WANG Hualing, et al

(*Department of Cardiology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of the nuclear receptor peroxisome proliferator－activated receptor (PPAR)γ activators on tumor necrosis factor α (TNF－α) expression in neonatal rat cardiac myocytes. *Methods*: Primary culture of cardiac myocytes was prepared from 1～3 days old Spraque－Dawley rats. Cardiac myocytes were pretreated with rosiglitazone at different concentrations and then stimulated with angiotensin Ⅱ (1 μmol/L). ELISA and reverse transcripition－polymerase chain reaction(RT－PCR) were used to examine TNF－α in cultured supernatants and TNF－α mRNA in cardiac myocytes, respectively. *Results*: Pretreatment of cardiac myocytes with rosiglitazone inhibited the increase of TNF－α and TNF－α mRNA induced by angiotensinⅡ in a concentration－dependent manner. *Conclusion*: Rosiglitazone inhibits the expression of TNF－α in cardiac myocytes, which provides a new way for treating chronic heart failure.

【Key words】Peroxisome proliferator－activated receptor γ; Tumor necrosis factor α; Angiotensin Ⅱ; Cardiac myocyte

过氧化体增殖物激活型受体 γ(peroxisome proliferator－activated receptors,PPARγ)是一种类固醇受体超家族受体。研究证实 PPARγ 激动剂抑制血管平滑肌中的炎症反应及激活单核细胞合成肿瘤坏死因子(TNF－α),但有关 PPARγ 配体对心肌细胞炎症反应影响的研究较少。本实验通过观察 PPARγ 配体罗格列酮对乳鼠心肌细胞合成 TNF－α 的影响,旨在探讨该药物对神经体液细胞因子的调节作用。

1 材料和方法

作者介绍:汪华玲(1977－),女,硕士,
主要研究方向:心力衰竭。

1.1 材料

1.1.1 主要仪器

CO_2 孵箱,XSZ－D2 型倒置显微镜,超净工作台,紫外分光光度计,PCR 自动扩增仪,凝胶电泳分析系统。

1.1.2 药品及试剂

罗格列酮原料药(合肥森瑞有限公司),TNF－αELISA 检测试剂盒(北京晶美生物工程有限公司),RT－PCR 检测试剂盒(TaKaRa 大连宝生工程有限公司),Trizol(上海生工生物工程公司),引物(华大基因－上海鼎安生物科技有限公司),胎牛血清(杭州四季青)等。

1.1.3 动物及器械

出生 1～3 天 Sprague－Dawley 乳鼠(第三军医大学大坪医院动物中心),100 目不锈钢筛网,手术器械:眼科剪和眼

维普资讯 http://www.cqvip.com

科镊各两把,培养皿,培养瓶,盖玻片细胞计数板。

1.2 方法

1.2.1 乳鼠心肌细胞的分离(参照文献[1]有改进)

取乳鼠开胸取心脏,剪去心房及血凝块后剪成 1mm×1mm×1mm 小块,加 0.125% 胰酶消化,取上清液。反复消化 7、8 次,直至心肌组织消化完为止。上清液过滤、离心。培养液悬浮沉淀细胞,将细胞种植于培养瓶中 37℃孵育 2h,吸出含有未贴壁细胞的培养液,重复两次,调整细胞浓度至 1×10^6/ml,接种到培养瓶中,4～5 天后进行细胞活力的测定。

1.2.2 罗格列酮、AngⅡ处理心肌细胞

取上述 4 瓶心肌细胞(编号为 1、2、3、4);1、2 瓶分别加入罗格列酮,终浓度为 5μmol/l、50μmol/l,预处理 30min。1～3 瓶加入 AngⅡ,终浓度为 1μmol/l,37℃孵育 24h,离心取上清,提取心肌细胞总 RNA。

1.2.3 检测方法

ELISA 法检测上清液 TNF－α 含量,RT－PCR 法检测心肌细胞 TNF－αmRNA 表达。

1.2.4 心肌细胞总 RNA 的提取

心肌细胞培养瓶中加入 0.125% 胰酶消化 1～2min,加含 20% FBS 的 DMEM 终止消化,在显微镜下观察至心肌细胞完全悬浮,细胞悬液吸入 EP 管中,离心(4℃ 5000r/min)2min,弃上清液,加入 800μ 1Trizol,剧烈震荡,再加入 200μl 氯仿震荡 30s,4℃ 12000r/min 离心 5min,上清液转移至另一离心管中加入等体积的异丙醇,室温放置 5min,12000r/min 离心 5min,小心弃上清液加入 75% 酒精 700μl,4℃ 12000r/min 离心 2min,重复两次尽可能吸走上清液,沉淀用 30μl 1DEPC－H_2O 溶解,－80℃保存。

表 1 不同浓度的罗格列酮对 AngⅡ诱导乳鼠心肌细胞分泌 TNF－α 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group	TNF－α(pg/ml)
Control	6.7±0.8
AngⅡ(1μmol/L)	88.0±7.21▲
AngⅡ＋Ros(5μmol/L)	48.9±3.4#
AugⅡ＋Ros(50μmol/L)	10.1±1.1▲

▲$P<0.01$ vs 处理组,#$P<0.01$ vsAngⅡ处理组

表 2 RT－PCR 扩增后 TNF－α 与 β－Actin 电泳条带灰度比值($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Group	the odds
Control	undetected
AngⅡ(1μmol/L)	0.78±0.21▲
AngⅡ＋Ros(5μmol/L)	0.53±0.15#
AngⅡ＋Ros(50μmol/L)	0.36±0.11#

▲$P<0.01$ vs 处理组,#$P<0.01$ vsAngⅡ处理组

1.2.5 RT－PCR 法检测心肌细胞 TNF－αmRNA 表达(按试剂盒说明书操作)

TNF－α 引物(678bp):上游引物 5'－CGCTCTGTCTACTGAAC－3',下游引物 3'－GTTAGAAGGACACAGACTGG－5'。β－Actin 引物(472bp):上游引物 5'－TGGCACCACACCTDCTACAA－3'下游引物 3'－GCAGCTCGTAGCTCTrCT－5'30℃ 10min,42℃ 30min,99℃ 5min,5℃ 5min 一个循环进行反转录反应。94℃ 5min,58℃2min,72℃ 2min1 个循环;94℃ 30s,58℃ 30s,72℃ 45s 35 个循环;72℃ 7min 进行 PCR 反应。反应结束后,取 PCR 反应液 10μl,1.2% 的琼脂糖凝胶电泳,并求出条带灰度与 β－Actin 标准条带的比值。

1.2.6 统计学处理

所有数据以均数±标准差表示($\bar{x}\pm s$),两组间均数比较用 t 检验,多组间均数比较用方差分析 q 检验,SPSS11.0 统计分析软件进行处理,$P<0.05$ 有统计学意义。

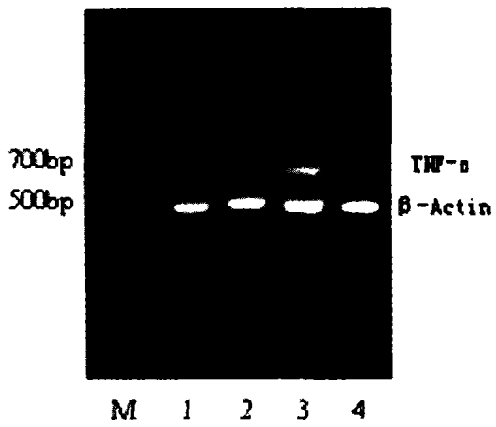


图 1 心肌细胞各种处理组 TNF－αmRNAPCR 产物凝胶电泳结果

注:M:标记物 1、2、3、4 分别为罗格列酮(50μmol/L)＋AngⅡ(1μmol/L)、罗格列酮(5μmol/L)＋AngⅡ(1μmol/L)、AngⅡ(1μmol/L)、4 为对照组

2 结 果

2.1 罗格列酮对 AngⅡ刺激乳鼠心肌细胞 TNF－α 蛋白质合成的影响

正常乳鼠心肌细胞几乎不表达 TNF－α,给予 AngⅡ刺激后其表达增加($P<0.01$),给予 5μmol/L 罗格列酮预处理后 TNF－α 蛋白质合成下降($P<0.01$),50μmol/L 罗格列酮预处理组 TNF－α 蛋白质合成进一步下降($P<0.01$)(表 1)。

2.2 罗格列酮对体外培养的乳鼠心肌细胞 TNF－αmRNA 表达的影响

用 TNF－α 条带灰度与 β－Actin 条带灰度比值对 β－Actin mRNA 表达量进行半定量分析。对照组心肌细胞无 TNF－α mRNA 表达,AngⅡ(1μmol/L)处理心肌细胞组有 TNF－αmRNA 表达($P<0.01$)。罗格列酮(5、50μmol/L)预处理心肌细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞,则抑制 AngⅡ刺激的心肌细胞 TNF－α mRNA 表达($P<0.05$),且浓度越高作用越大(图 1,表 2)。

3 讨 论

实验发现,正常心肌细胞不表达 TNF－α,AngⅡ促进心肌细胞 TNF－αmRNA 表达和蛋白合成。PPARγ激动剂罗格列酮抑制 AngⅡ诱导的心肌细胞 TNF－αmRNA 表达和蛋白合成,且在一定范围内呈浓度依赖性。

TNF－α是一种主要由激活的单核－巨噬细胞产生的炎症细胞因子,正常心肌细胞几乎不表达 TNF－α,慢性心力衰竭(congestive heart failure, CHF)时在多种因素刺激下,心肌细胞大量表达 TNF－αmRNA 及合成 TNF－α[2]。TNF－α在 CHF、心肌梗死、心肌炎和扩张性心肌病等多种心血管疾病的发生发展中起重要作用。目前许多研究结果表明心力衰竭时 RAS 系统过度激活、细胞因子过度表达均能抑制心脏功能,但两者之间是否存在一定关系已成为研究的热点。Kalra 等研究发现 AngⅡ1 型受体结合 AngⅡ后被激活后通过蛋白激酶 C(PKC)途径诱导成年哺乳动物心肌 TNFα表达上调[3]。同时许多研究表明 AngⅡ转换酶抑制剂(ACEI)、AngⅡ1 型受体拮抗剂降低心力衰竭病人外周血中 TNFα水平。本实验研究结果表明 AngⅡ在一定范围内呈浓度依赖性诱导离体心肌细胞表达 TNFα,进一步证实 RAS 和 TNF－α在心脏中存在着生物对话,提示两者可形成一个自我维持、自我放大的自/旁分泌环,致 RAS 过度激活、细胞因子大量分泌,促进心力衰竭的发生、发展。

PPARγ是一种致密分子构成的类固醇受体超家族,主要在大肠和脂肪组织中表达,近来研究[4]发现 PPARγ在心肌组织中亦有表达。噻唑烷二酮类(格列酮类)抗糖尿病药是 PPARγ的合成型特异性配体,主要包括罗格列酮、吡格列酮等。PPARγ作用广泛,涉及脂质代谢、炎症反应、细胞增殖等方面。罗格列酮抑制激活的单核－巨噬细胞分泌 TNFα、白介素－6、白介素－1β,T 淋巴细胞表达白介素－2 等细胞因子[5]。吡格列酮预处理的小鼠在广泛前壁心肌梗死后较对照组肿瘤坏死因子、转化生长因子和单核细胞趋化因子的分泌减少[6],但其对体外心肌细胞的作用研究较少。本实验通过体外分离培养乳鼠心肌细胞,模拟 CHF 时神经内分泌系统过度激活的内环境,用 AngⅡ作为刺激因素诱导心肌细胞表达 TNF－α,PPARγ特异性激动剂罗格列酮抑制 AngⅡ的这一作用,提示提示 PPARγ激动剂可能在体内通过良性调节细胞因子改善心力衰竭。在单核－巨噬细胞中 PPARγ激动剂通过拮抗调节细胞因子的转录因子如核因子 κB(NP－κB)、激动蛋白－1(AP－1)而起到抗炎作用[7],推测 PPARγ激动剂亦可能通过这些途径抑制心肌细胞表达 TNFα,尚待进一步研究。有研究发现[8,9] PPARγ激动剂抑制血管紧张素(AT_1)受体启动子活性,降低 AT_1 受体 mRNA 表达及其蛋白水平可能系 PPARγ激动剂的抗 CHF 的另一种机制。

参 考 文 献

[1] 沈 静,谢苗荣,徐 雍,等.乳鼠心肌细胞培养及纯化方法的改良[J].中国医药导刊,2001;3(3):225－229.

[2] Torre－Amione G, Kapadia S, Lee J, et al. Tumor necrosis factor－alpha and Tumor necrosis factor receptorsin the failing heart[J]. Circulaton, 1996;93:704－711.

[3] Kalra－D, Sivasubramanian－N, Mann－D－L. Angiotensin Ⅱ induces tumor necrosis factor biosynthesis in the adult mammalian heart through a protein kinase C－dependent pathway[J]. Circulation, 2002;105(18):2198－2205.

[4] Mukherjee R, Jow L, Croston GE, et al. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator－activated receptor(PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgammal and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists[J]. J BiolChem, 1997;272:8071－8076.

[5] Jiang C, Ting AT, Seed B. PPARγ agonist inhibit production of monocyte inflammatory cytokines[J]. Nature, 1998;391(6662):82－86.

[6] Tian－li Yue, Jun Chen, Weike Bao, et al. In vivo myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by the peroxisome proliferator－activated receptor gamma agonist rosiglitazone[J]. Circulation, 2001;104:2588－2594.

[7] Ricote M, Li AC, Willson TM, et al. The peroxisome proliferator－activated receptor gamma is a negative regulator of macrophage activation[J]. Nature, 1998;391:79－82.

[8] Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, et al. Peroxisome proliferator－activated receptorγ activators downregulate angiotensin Ⅱ type 1 receptor in vascular smooth muscle cells[J]. Circulation, 2000;102(3):1834－1839.

[9] Sugawara A, Takeuchi K, Uruno A, et al. Transcriptional suppression of type 1 Angiotensin Ⅱ receptor gene expression by PPAR γ in vascular smooth muscle cells[J]. Endocrinology, 2001;142(7):3125－3134.