DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.16.015
第25卷第16期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 16
1438 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)16-1438-03

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

胡 琴,李隆贵,耿昭华,金 丰 (第三军医大学附属新桥医院全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要:目的 观察腹主动脉缩窄术后大鼠肥厚心肌能量代谢转换及卡维地洛的作用,探讨卡维地洛减弱压力负荷性心肌能量代谢胚胎型转换的分子调控机制。方法 用卡维地洛对腹主动脉缩窄术(CAA)后4周的雄性Wistar大鼠进行干预,12周后观察腹主动脉缩窄组(CAA)和卡维地洛干预组(CAR)及假手术组(SH)大鼠各项指标的变化。结果 CAA组大鼠左室心肌明显肥厚(3.41±1.30 *vs* 2.46±1.31, $P<0.05$),血清和心肌游离脂肪酸蓄积,左室肥厚心肌M-CPT-Ⅰ和MCAD mRNA的表达下调($P<0.05$)。卡维地洛治疗12周后能够明显改善上述各项指标的变化($P<0.05$)。结论 压力负荷性大鼠肥厚心肌能量代谢发生胚胎型转换;卡维地洛通过减少左室心肌脂肪酸氧化限速酶和关键酶的基因表达,减弱心肌胚胎型能量代谢的转换从而改善肥厚心肌的能量代谢,这可能是卡维地洛心肌保护作用的机制之一。

关键词:压力负荷;能量代谢胚胎型转换;卡维地洛
中图法分类号:R364.2;R542.202;R971.93 文献标识码:A

Molecular mechanism of the reversion back towards fetal energy metabolism occurring with the development of cardiac hypertrophy and the role of Carvedilol

HU Qin, LI Long-gui, GENG Zhao-hua, JIN Feng (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the reversion of the metabolic gene expression pattern of hypertrophic cardiac and role of Carvedilol and to explore the molecular regulatory mechanism of Carvedilol on attenuating the reversion back towards fetal energy metabolism occurring with the development of cardiac hypertrophy. Methods A model of hypertrophy induced by coarctation of abdominal aorta (CAA) in male Wistar rats was employed and changes of parameters such as hemodynamics, ventricular remodeling parameters, free fatty acid in blood serum and cardiac myocyte and expressions of muscle carnitine palmitoyltransferase-Ⅰ (M-CPT-Ⅰ) and medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) mRNA were investigated in the experimental animals in operation group (CAA), sham operation group (SH) and Carvedilol intervention group (CAR) at 16 weeks after operation. Results Significant hypertrophy was found in the left ventricle in CAA group (3.41±1.30 *vs* 2.46±1.31, $P<0.05$). Accumulated fatty acid and down-regulated level of M-CPT-Ⅰ and MCAD mRNA were also found during hypertrophic growth ($P<0.05$). Carvedilol could attenuate these changes after 12-week therapy ($P<0.05$). Conclusion Pressure overload can down-regulate the expression of rate-limiting enzyme and key enzym
switch of energy substrate. Antihypertensive therapy with carvedilol, a vasodilating alpha-and beta-adrenoreceptor antagonist, can attenuate this reversion of the metabolic gene expression pattern towards fetal levels through the up-regulation of M-CPT-Ⅰ and MCAD mRNA expressions. This may be one of the mechanisms of cardiac protection of Carvedilol.

Key words: pressure overload; the reversion back towards fetal energy metabolism; Carvedilol

哺乳动物在心脏发育过程中主要以葡萄糖和乳酸作为能源,出生后则为以脂肪酸氧化为主,以便为心肌提供更多的能量;但在病理性心肌肥厚时心脏能源又向葡萄糖和乳酸转化,此即心肌能量代谢的"胚胎型转换"[1]。随着病程进展,这一适应性改变终将导致心肌能源的匮乏。探讨这一转换的发生机制,对阻遏心力衰竭病理生理的恶性循环具有重要意义。本研究通过腹主动脉缩窄大鼠左室心肌肥厚模型,观察脂肪酸氧化限速酶——肌型肉碱棕榈酰易位酶Ⅰ(Muscle Carnitine Palmitoyltransferase-Ⅰ, M-CPT-Ⅰ)和关键酶——中链脂酰辅酶A脱氢酶(Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase, MCAD)基因表达变化,探讨第三代β阻

作者简介:胡 琴(1972-),女,四川省南充市人,博士,讲师,主要从事肥厚心肌能量代谢方面的研究,发表论文10篇,现在贵阳医学院附属医院心内科工作。电话:(0851)6742897

收稿日期:2002-09-16;修回日期:2003-02-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

滞剂卡维地洛对肥厚心肌能量代谢的影响及其分子调控机制。

1　材料与方法

1.1　建立大鼠腹主动脉缩窄模型及实验分组

纯种雄性Wistar大鼠, 体质量(189±22.3)g, 由第三军医大学实验动物中心提供。按 Sahlgren 法[2], 大鼠腹腔麻醉后在左肾动脉开口上方处游离腹主动脉, 旁置一 6 号针头, 以 1 号丝线结扎后抽出针头, 使腹主动脉缩窄达 65%～70 %; 常规抗感染 3 d, 密切观察动物反应。术后 4 周将 24 只大鼠随机分为卡维地洛干预(CAR)组: 饮水中加入卡维地洛(30 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$)喂养 12 周; 腹主动脉缩窄组(CAA): 不干预, 观察 12 周。另以条件相同的大鼠, 体质量(179±31.3)g, 在腹主动脉穿线但不结扎, 作为假手术组(SH), 术后观察 16 周。

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用 10 %氨基甲酸乙酯溶液(10 ml/kg)腹腔注射麻醉, 分离右颈动脉、静脉, 分别插管, 以 RM-6000 型 8 道生理记录仪(日本 Nihon Kohden 公司产)记录心率(HR)、主动脉收缩压(SAP)、主动脉舒张压(DAP)及左室舒张末压(LVEDP)。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)、右心室湿质量。以左心室湿质量/体质量(LVW/BW, mg/g)和右心室湿质量/体质量(RVW/BW, mg/g), 分别代表左、右心室心肌的质量指数。取左室心肌冻存于液氮中。同时预留 1 ml 血清和 100 mg 新鲜的心肌组织备用。

1.3　检测血清和心肌游离脂肪酸含量

按 Nixion[3] 方法, 根据吸光率计算 1 ml 血清和 100 mg 心肌游离脂肪酸的含量(单位: nmol/L)。

1.4　RT-PCR 检测心肌 M-CPT-Ⅰ和 MCAD mRNA 的表达

采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步法, 按 TRIZOL 试剂盒(上海生工)说明提取心肌组织 RNA。

甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法鉴定 RNA 的完整性。紫外分光法确定 RNA 的量和纯度。取总 RNA 2.5 μg 逆转录合成 cDNA, 然后按照分子克隆进行半定量 PCR 反应。寡聚核苷酸引物的合成(上海生工)见表 1。M-CPT-I 反应条件: 94 ℃变性 30 s, 54 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 进行 42 个循环, 72 ℃延伸 10 min; MCAD 反应条件: 94 ℃变性 30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 1 min, 进行 35 个循环, 72 ℃延伸 10 min; 内参β-actin 反应条件同 MCAD。反应结束后, 各取 PCR 产物 4 μl 进行 1.2% 琼脂糖电泳, 并用 Gel Doc 2000 凝胶图像分析仪扫描, PCR 产物量以光密度值×面积表示, 扩增片段与β-actin 的光密度比值(*D*)作为目的片段 mRNA 的相对含量。

表 1　RT-PCR 扩增产物的引物序列

Tab 1　Oligonucleotide sequences of primers for RT-PCR

Species	Upper primer	Lower primer
M-CPT-I (690 bp)	5′-TATGTGAGGATGCTGCTTCC-3′	5′-CTCGGAGAGCTAAGCTTGTC-3′
MCAD (458 bp)	5′-AGCCTTCACCGGATTCATCG-3′	5′-TAGCGAGCTGGTTGGCAATA/TC-3′
β-actin (764 bp)	5′-TTGTAACCAACTGGGACGATATGG-3′	5′-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3′

1.5　统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析(One way ANOV), 两两比较用 Newman-Keuls 检验。

2　结果

2.1　术后大鼠一般情况

3 组大鼠均未出现呼吸困难、水肿、进食困难、尿少等心衰症状。CAA 组动物术后 16 周左室明显肥厚, 而右室未见明显改变; CAR 组左室心肌亦有增厚。

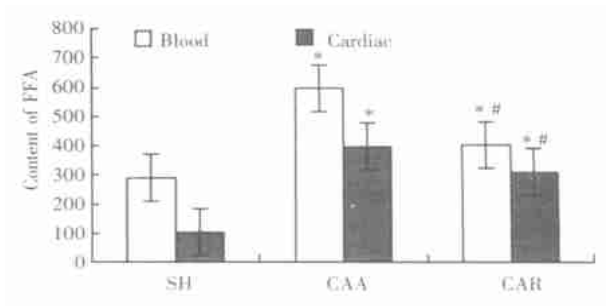
2.2　大鼠血流动力学及心室重塑指标的改变, 见表 2

表 2　大鼠血流动力学和心室重塑指标的改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of hemodyanmics and ventricular remodeling parameters in rats ($\bar{x}\pm s$)

Group (n=8)	HR (beats/min)	MAP (mmHg)	LVEDP		(mg/g)
SH	425±12 *	118.0±14.2 *	4.2±0.8 *	2.46±1.31 *	0.68±0.07
CAA	399±15 △	194.2±19.8 △	14.0±1.4 △	3.41±1.30 △	0.66±0.05
CAR	345±20 *	146.0±17.0 △*	8.3±0.7 △*	2.79±1.10 △*	0.66±0.05

*: $P<0.05$ *vs* CAA; △: $P<0.05$ *vs* SH



2.3　血清和心肌游离脂肪酸的含量变化, 见图 1

*: $P<0.05$ *vs* sham operation; ♯: $P<0.05$ *vs* CAA

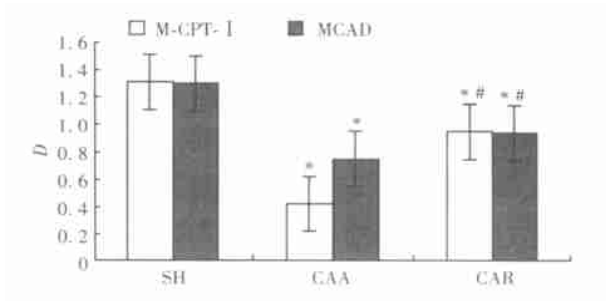
图 1　3 组大鼠血清和心肌游离脂肪酸含量的比较

Fig 1　Comparison of the contents of free fatty acid (FFA) in blood serum and cardiac muscle in rats in the three groups

2.4　M-CPT-Ⅰ和 MCADPCR 扩增结果

M-CPT-Ⅰ和 MCAD 的 RT-PCR 产物电泳结果显示扩增片段长分别为 690 bp 和 509 bp, 与预期设计的目的片段大小相同。

2.5　3 组大鼠心肌 M-CPT-Ⅰ和 MCAD mRNA 表达变化, 见图 2



*: $P<0.05$ *vs* sham operation; ♯: $P<0.05$ *vs* CAA

图 2　大鼠心肌 M-CPT-Ⅰ和 MCAD mRNA 表达变化的比较

Fig 2　Comparison of mRNA expressions of M-CPT-Ⅰ and MCAD by RT-PCR in rats in the three groups

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

胚胎时心肌处于一个相对缺氧的环境，其能量底物来源于耗氧量较少的葡萄糖和乳酸代谢。出生后由于哺乳动物的饮食含高脂肪的奶酪，使心肌迅速转为主要利用脂肪酸，相应的伴有编码脂肪酸氧化酶的基因表达急剧增加。心脏存储脂质的能力是有限的，仅够维持心肌数秒的功能。正常情况下进入心肌细胞的脂肪酸大部分被氧化。葡萄糖产能与脂肪酸氧化产能是有区别的。脂肪酸氧化循环以大量耗氧为代价产生更多的ATP。而葡萄糖氧化耗氧相对较少[3]。已经发现：先天脂肪酸氧化酶MCAD/极长链酰基辅酶A脱氢酶(Very long-chain acyl-CoA dehydrogenase，VLCAD)基因突变的新生儿在应激诱导下发生低血糖、肝功能不全、心肌病及猝死。这一结果说明脂肪酸氧化对心肌能量生成的重要性。

本实验显示腹主动脉缩窄术后16周左室心肌明显肥厚；游离脂肪酸蓄积增加，利用减少，伴随线粒体脂肪酸氧化限速酶M-CPT-Ⅰ和脂肪酸氧化关键酶MCAD基因表达下调；脂肪酸利用减少与M-CPT-Ⅰ和MCAD基因的表达下调相一致($r=0.999$，$P=0.033$)。说明肥厚心肌存在脂肪酸氧化酶基因调控的改变，引发脂肪酸利用障碍，导致心肌能量代谢模式向胚胎型转换。与既往许多学者的研究相一致[4,5]。

卡维地洛作为第3代的β受体阻滞剂，兼有α受体阻滞、抗氧化、抗凋亡、抗心律失常、抑制中性粒细胞浸润等特性，为心血管疾病的防治提供了理论基础，已经成为一个重要的心肌保护剂。它已经获得FDA的批准用于临床心衰治疗[6]。但关于卡维地洛对心肌能量代谢的研究甚少，尤其在体实验研究。本研究重点探讨了卡维地洛对肥厚心肌能量代谢的影响。采用30 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$的卡维地洛治疗腹主动脉缩窄术后4周的大鼠，治疗12周后发现该剂量的卡维地洛在改善心室肥厚的同时，能够减少血清和心肌游离脂肪酸的蓄积，并且增加线粒体脂肪酸氧化限速酶M-CPT-Ⅰ和脂肪酸氧化关键酶MCAD基因的表达。这一结果说明中等剂量的卡维地洛就能够促进压力负荷性肥厚心肌对脂肪酸的利用，增加线粒体对脂肪酸的摄取和脂肪酸的氧化。卡维地洛改善肥厚心肌能量代谢可能与其抗氧化作用有关。这可能是卡维地洛心肌保护作用的机制之一[7~9]。

Sack等[10]采用Nothern blot技术检测发现：卡维地洛(治疗浓度为$2\,400\times10^{-6}$)能够上调自发性高血压大鼠心肌脂肪酸氧化相关的酶—长链酰基辅酶A合成酶(Long-chain acyl-CoA synthetase，LCAS)和中链脂酰辅酶A脱氢酶(MCAD)的基因表达，增加心肌脂肪酸的氧化，减弱肥厚心肌能量代谢的胚胎型演化。Sack认为卡维地洛的这一作用与其β受体阻滞有关。因为正常志愿者口服卡维地洛后，并不影响其血清游离脂肪酸的含量。那其它的β受体阻滞剂是否也有上述作用，尚不清楚。

结合前期的研究，本研究阐明了肥厚心肌能量代谢胚胎型转换的分子机制和卡维地洛对肥厚心肌能量代谢的改善作用，说明卡维地洛维持正常心肌能量代谢模式是卡维地洛心肌保护作用的机制之一。但是卡维地洛心肌保护作用仍有待进一步的研究。

参考文献：

[1] Sack M N, Rader T A, Park S, *et al*. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart[J]. Circulation, 1996, 94(11): 2837—2842.

[2] Sahlgren B, Eklof A C, Aperia A. Studies of the renal component of the hypertension in rats with aortic construction. Role of angiotensin Ⅱ[J]. Acta Physiol Scand, 1986, 127(4): 443—448.

[3] Nixon M, Chan S H. A simple and sensitive colorimetric method for the determination of long-chain free fatty acids in subcellular organelles[J]. Anal Biochem, 1997, 97(3): 403—409.

[4] Sack M N, Kelly D P. The energy substrate switch during the development of heart failure: Gene regulatory mechanisms[J]. Int J Mol Med, 1998, 1(1): 17—24.

[5] Schwartz K, Boheler K R, de la Bastie D, *et al*. Switches in cardiac muscle gene expression as a result of pressure and volume overload[J]. Am J Physiol, 1992, 262(3 Pt 2): R364—R369.

[6] 李隆贵，王 苏，耿召华，等. 第3代β-阻滞剂卡维地洛对心力衰竭的干预及其对sFas的影响[J]. 第三军医大学学报，2002，24(8)：974—976.

[7] 苗 雅，杨欣国，王玉霞. 卡维地洛防治缺血性心脏病心衰及其抗氧化应激作用的动物实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(8)：931—932.

[8] Dandona P, Kame R, Ghanim H, *et al*. Carvedilol inhibits reactive oxygen species generation by leukocytes and oxidative damage to amino acids[J]. Circulation, 2000, 101(2): 122—124

[9] Santos D L, Moreno A J, Leino R L, *et al*. Carvedilol protects against doxorubicin-induced mitochondrial cardiomyopathy[J]. Toxicol Appl pharmacol, 2002, 185(3): 218—227.

[10] Sack M N, Harrington L S, Jonassen A K, *et al*. Coordinate regulation of metabolic enzyme encoding genes during cardiac development and following carvedilol therapy in spontaneously hypertensive rats[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2000, 14(1): 31—39.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net