

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.17.003

缺血/再灌注大鼠心肌 PPAR- γ 表达变化对再灌注心律失常的影响*陈 华¹,莫新玲^{2△},何学恕²,谢 婷²

(1. 桂林医学院第二附属医院,广西桂林 541001;2. 桂林医学院附属医院,广西桂林 541001)

[摘要] 目的 探讨不同预处理的心肌缺血/再灌注(I/R)动物模型中 PPAR- γ 表达对再灌注心律失常的影响。方法 32 只 SD 大鼠分为 4 组($n=8$):罗格列酮+I/R 组(ROS 组),GW9662+I/R 组(GW 组),I/R 组(I/R 组),假手术组(Sham 组)。采用冠状动脉左前降支结扎法制造缺血/再灌注动物模型,缺血 30 min,再灌注 2 h。动态肢体 II 导联心电图检测,荧光定量 PCR 检测 PPAR- γ mRNA 和 Western blot 检测 PPAR- γ 蛋白质的表达变化。结果 分别在术前、缺血 30 min、再灌注 1 h、再灌注 2 h 4 个时间点检测心电图 QRS 波宽度增加幅度由大到小依次是 ROS 组、I/R 组、GW 组、Sham 组;ROS 组较其他组大鼠再灌注心律失常评分明显较高($P<0.05$),GW 组则相对减少。荧光定量 PCR 检测 ROS 组 PPAR- γ mRNA 表达水平明显上调($P<0.05$),GW 较 I/R 组和 ROS 组表达下调($P<0.05$)。PPAR- γ 蛋白质表达结果与 PPAR- γ mRNA 相似。结论 心肌 PPAR- γ 表达上调可能增加心肌 I/R 动物模型再灌注心律失常的发生。

[关键词] 心肌缺血;心肌再灌注损伤;PPAR- γ ;再灌注心律失常;罗格列酮

[中图分类号] R541.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)17-2313-03

Effects of myocardial PPAR- γ expression change on reperfusion arrhythmias in ischemia/reperfusion rats*Chen Hua, Mo Xinling[△], He Xueshu, Xie Ting

(1. The Second Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China;

2. Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of PPAR- γ expression on reperfusion arrhythmias in different preconditioning myocardial ischemia/reperfusion(I/R) animal model. **Methods** Thirty-two SD rats were randomly divided into 4 groups($n=8$): rosiglitazone+ I/R group (ROS group), GW9662+I/R group(GW group), I/R group and sham group (Sham group). The I/R animal model was constructed by ligation of the left anterior descending coronary artery, with ischemia for 30 min and reperfusion for 120 min. The dynamic limb II lead electrocardiogram monitoring was performed; PPAR- γ mRNA was detected by fluorescent quantitative PCR and the change of PPAR- γ protein expression was detected by Western blot. **Results** The increasing range of QRS wave width detected before operation, at 30 min of ischemia, at 1, 2 h of reperfusion from large to small were in turn the ROS group, I/R group, GW group and Sham group; the reperfusion arrhythmia score in the ROS group was significantly higher than that in the other groups($P<0.05$), while the GW group was relatively reduced. The expression level of PPAR- γ mRNA in the ROS group detected by fluorescent quantitative PCR was significantly up-regulated($P<0.05$), while which in the GW group was down-regulated compared with the I/R group and ROS group($P<0.05$). The expression of PPAR- γ protein was similar to that of PPAR- γ mRNA. **Conclusion** Up-regulation of myocardial PPAR- γ expression may increase the occurrence of reperfusion arrhythmias in myocardial I/R animal model.

[Key words] myocardial ischemia; myocardial reperfusion injury; PPAR- γ ; reperfusion arrhythmias; rosiglitazone

心肌梗死是威胁人类健康的主要杀手之一,可能会引发心源性猝死^[1-2],缺血/再灌注(I/R)治疗是目前治疗心肌梗死的主要手段,不过伴随的 I/R 损伤是影响治疗的负面因素,再灌注心律失常(RA)是其中原因之一^[3],与心源性猝死密切相关^[4]。近期研究发现过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (PPAR- γ)表达增多会导致动物恶性心律失常的发生率增加^[5],临床研究中亦发现 PPAR- γ 激动剂(如罗格列酮、吡格列酮等)会增加患者心血管事件的发生^[6],因此本研究旨在探讨刺激 PPAR- γ 上调对再灌注心律失常的影响。

1 材料与方

1.1 材料 PPAR- γ 激动剂罗格列酮及 PPAR- γ 抑制剂 GW9662 购自 Sigma 公司,超纯 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 反应试剂盒、辣根过氧化物酶体标记山羊抗小鼠 IgG、GAPDH 内参抗体、一抗稀释液均购自北京康为世

纪生物科技有限公司,引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成;PPAR- γ 抗体购自 Santa Cruz, WIP 裂解液购自北京博奥森生物技术公司;BL-420F 生物机能实验系统购自成都泰盟科技公司,电脑动物呼吸机购自江西特力。

1.2 实验动物及分组 SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只,体质量 220~250 g(8~10 周龄),由广西医科大学动物实验中心提供。分为 4 组:Sham 组(开胸后冠脉左前降支只穿线,不结扎);I/R 组(结扎冠脉左前降支缺血 30 min,再灌注 120 min);ROS 组(术前罗格列酮 6 mg/kg 腹腔注射,以后操作同 I/R 组);GW 组(术前 GW9662 4 mg/kg 腹腔注射,以后操作同 I/R 组)。

1.3 大鼠心肌 I/R 模型的建立 采用结扎大鼠冠状动脉左前降支法,10%水合氯醛麻醉大鼠后切开颈部正中皮肤,钝性分离并剪开气管后插管接小型动物呼吸机,频率为 65 次/min,待大鼠呼吸平稳后在胸骨左侧第二肋间隙肋间肌 2~3 mm 处

* 基金项目:广西壮族自治区卫生厅自筹课题(Z2013492)。 作者简介:陈华(1970—),硕士,副主任医师,主要从事心电生理学研究。 △

切开皮肤,开胸后暴露心脏,剪开心包膜,用生理盐水沾湿的棉签轻压心脏。以 6-0 丝带缝针线在左心耳下缘内侧 1~2 mm 处,进针深度约为 1 mm,经由肺动脉圆锥右上方出针垫一硬质海绵条。以直视下可见被结扎血管供应区心肌变为苍白色或肿胀为有效。30 min 后松止血钳,拔出硬质海绵条,再灌注 120 min,结束后迅速剪下心脏,在心室前壁相同位置留取心肌组织液氮冷冻。

1.4 心率失常情况监测 分别观察术前开始时,结扎/穿线、30 min,拆线 1、2 h 时 ORS 波宽度变化,数值测量采用 BL-420F 系统软件工具取值;记录各组 I/R 后出现心律失常情况,心律失常评分采用 Curtis 和 Walker 标准^[7]:房性期前收缩 0 分,室性期前收缩 1 分,室性心动过速(≤ 2 次)2 分,室性心动过速(> 2 次)3 分,室颤 4 分。

1.5 荧光定量 PCR 检测 PPAR- γ mRNA 表达 取各组大鼠心肌组织,提取总 RNA 并测定浓度。取 5 μ g RNA 逆转录为 cDNA 后行荧光定量 PCR 反应。引物由 Primer 5.0 设计,序列如下:PPAR- γ 上游 5'-TGG ACC TCT CTG TGA TGG-3',下游 5'-CGC ACT TTG GTA TTC TTG-3',产物长度 173 bp;内参 GAPDH 上游 5'-TAC CCA CGG CAA GTT CAA CG-3',下游 5'-CAC CAG CAT CAC CCC ATT TG-3',产物长度 122 bp。建立实时定量 PCR 反应体系,并测定心肌细胞 PPAR- γ mRNA 在各组动物模型中的表达情况。大鼠心肌 PPAR- γ mRNA 表达水平的检测: $\Delta\Delta CT$ 值=平均样本 CT 值-平均内参 CT 值,用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 比较各组间 mRNA 荧光定量 PCR 拷贝数的差异。

1.6 Western blot 检测 PPAR- γ 蛋白质的表达 将液氮研磨后的心肌组织裂解后行总蛋白质定量,将 BSA 做为蛋白标准,计算样品蛋白浓度。将准备的各组样品经电泳、半干转膜、洗膜、发光处理,计算各目的条带与内参 GAPDH 的光密度值比值。

1.7 统计学处理 相对定量的结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行处理,余数据采用 SPSS 13.0 统计学软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,室早发生情况及心律失常评分采用单因素方差分析,其中两两比较采用 LSD 法;各组 PPAR- γ mRNA 及 PPAR- γ 蛋白质表达总体变化趋势比较采用析因方差分析,组内不同时间点比较、同一时间点不同组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心电图的变化

2.1.1 各组大鼠 QRS 波宽度变化及心律失常发生情况 见图 1、2。

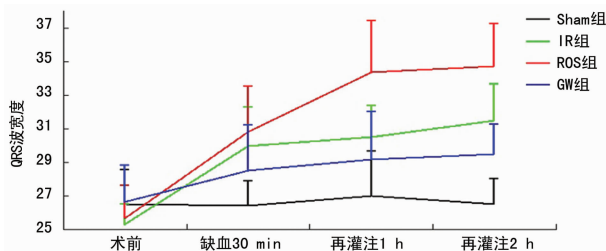


图 1 各组 QRS 波宽度变化

2.1.2 不同阶段心电图表现 见图 3。

2.2 再灌注心律失常评分 各组再灌注心律失常评分不同 ($F = 28.573, P < 0.05$), I/R 组 $[(2.13 \pm 0.84)$ 分]、ROS 组 $[(3.00 \pm 0.93)$ 分] 较 Sham 组大鼠再灌注心律失常评分 $[(0.25 \pm 0.46)$ 分] 明显较高 ($P < 0.05$), 且 ROS 组高于 I/R 组

($P < 0.05$), GW 组 $[(0.38 \pm 0.52)$ 分] 则与 Sham 组再灌注心律失常评分差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

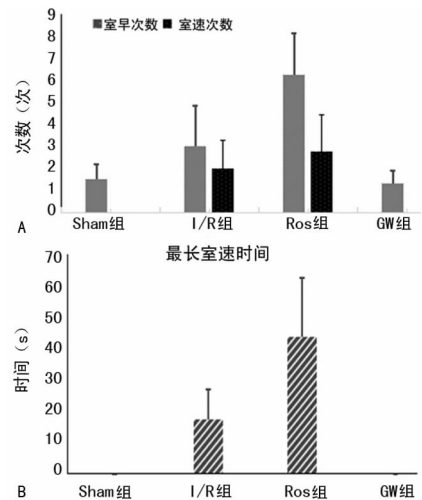


图 2 各组大鼠心律失常发生情况

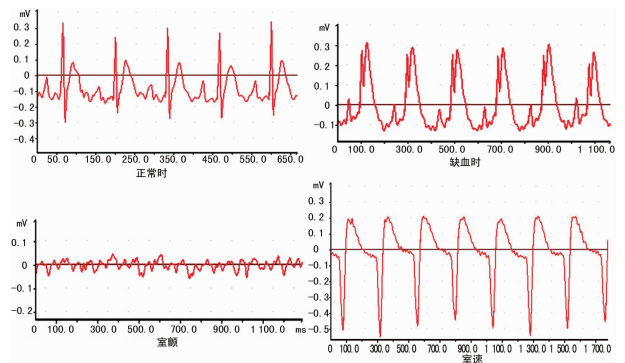


图 3 不同阶段心电图表现

2.3 各组 PPAR- γ mRNA 表达比较

2.3.1 各组 PPAR- γ 扩增曲线显示荧光强度和初始拷贝数呈良好的线性关系。溶解曲线峰值单一,无杂峰,表明荧光定量 PCR 产物纯度较高,反应具有良好的特异性。见图 4。

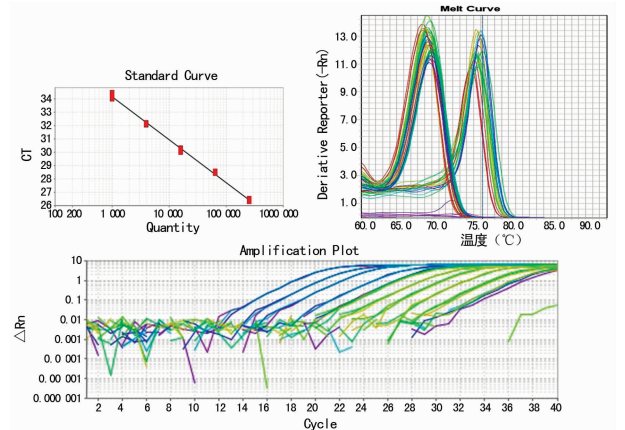
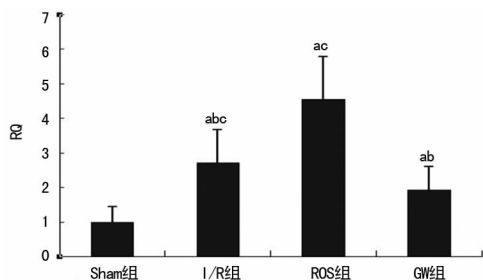


图 4 PPAR- γ 扩增曲线

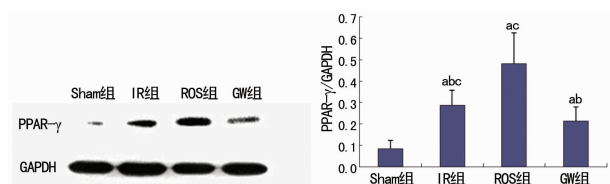
2.3.2 各组 PPAR- γ mRNA 相对表达量分别为 Sham 组 0.155 ± 0.047 , I/R 组 0.485 ± 0.048 , ROS 组 0.672 ± 0.064 , GW 组 0.293 ± 0.046 , 4 组间表达差异有统计学意义 ($F = P < 0.05$)。与 Sham 组比较,其他各组 PPAR- γ mRNA 表达上调 ($P < 0.05$), GW 组较 I/R 组和 ROS 组 PPAR- γ mRNA 表达下调 ($P < 0.05$), 见图 5。



^a: 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ^b: 与 ROS 组比较, $P < 0.05$; ^c: 与 GW 组比较, $P < 0.05$ 。

图 5 各组 PPAR-γ mRNA 表达水平

2.4 各组 PPAR-γ 蛋白表达比较 各组 PPAR-γ 蛋白质表达不同 ($F = 21.618, P < 0.05$), 其中 ROS 组大鼠 PPAR-γ 蛋白质表达较其他组明显增多 ($P < 0.05$), GW 组 PPAR-γ 表达较 ROS 组及 I/R 组下调 ($P < 0.05$), 见图 5。



^a: 与 Sham 组比较, $P < 0.05$; ^b: 与 ROS 组比较, $P < 0.05$; ^c: 与 GW 组比较, $P < 0.05$ 。

图 6 各组 PPAR-γ 蛋白质的表达水平

3 讨论

急性心肌梗死的发病率逐年上升,严重影响生活质量和生命健康。随着血管再通手段的丰富,再灌注损伤成为影响疗效的负面因素。再灌注心律失常既是 I/R 成功的可靠标志,亦是 I/R 后治疗的主要阻力。PPAR-γ 是一种依赖配体激活的转录因子,其在心肌的表达量相对较高^[8]。Bilal 等^[9]研究发现 PPAR-γ 表达增多能间接减少脂肪分解,并降低血糖水平,从而减少心血管事件的发生;申琳等^[10]研究认为 PPAR-γ 抑制 I/R 损伤诱导的心肌细胞凋亡。本研究发现缺血/再灌注模型大鼠心肌 PPAR-γ 表达上调后心律失常评分升高,即心律失常发生增加;其中经罗格列酮预处理的大鼠心肌 PPAR-γ 呈高表达状态,随之而来的是心律失常发生增加,特别是恶性心律失常,实验当中出现两只 ROS 组大鼠因恶性心律失常死亡,而预实验阶段并未发现罗格列酮增加正常大鼠心律失常的发生。

早在 2011 年 Morrow 等^[5]研究发现,虽然 PPAR-γ 高表达能减少脂肪分解,不过会导致心肌细胞脂质蓄积,影响心肌细胞正常功能而诱发心律失常。心肌细胞电生理异常是心律失常发生的前提,心肌细胞膜的稳定影响心肌细胞正常活动,心肌细胞膜 $Na^+ - K^+ - ATP$ 、 $Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP$ 通道被广泛报道认为与心律失常的发生息息相关,过高的 PPAR-γ 表达造成心肌细胞脂质蓄积,心肌脂质蓄积会延缓 $Na^+ - K^+ - ATP$ 通道开放,从而影响动作电位时相,心电图显示 QRS 增宽,这对心肌同步收缩造成干扰,心律失常由此发生,本研究记录心电图符合这一状况;同样 PPAR-γ 对 Ca^{2+} 通道作用同样影响动作电位导致心律失常的发生,本研究同样证实罗格列酮预处理的大鼠心肌 PPAR-γ 高表达状态下心律失常更易发生,抑制 PPAR-γ 表达后心律失常发生则降低;国内李兴暖等^[11]研究发现粟米草提取物可通过提高 $Ca^{2+} - ATPase$ 活性减少 I/R 致心律失常的发生,当然粟米草提取物是否通过减少 PPAR-γ 表达

而发挥这一作用不得而知,需要更进一步的研究证实。

总之,本研究结果发现 PPAR-γ 高表达会导致再灌注心律失常发生增加,抑制 PPAR-γ 表达则能逆转这一现象,PPAR-γ 虽能保护再灌注心肌存活,但高表达同样会诱发心律失常影响心肌梗死后的生存率。

参考文献

- [1] Daly LE, Hickey N, Graham IM, et al. Predictors of sudden death up to 18 years after a first attack of unstable angina or myocardial infarction[J]. Br Heart J, 1987, 58(6):567-571.
- [2] Odemuyiwa O, Farrell TG, Malik M, et al. Influence of age on the relation between heart rate variability, left ventricular ejection fraction, frequency of ventricular extrasystoles, and sudden death after myocardial infarction[J]. Br Heart J, 1992, 67(5):387-391.
- [3] Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog[J]. Arch Pathol, 1960, 70(1):68-78.
- [4] Matthew F, Gen S, Michael D, et al. Dissociation of hemodynamic and electrocardiographic indexes of myocardial ischemia in pigs with hibernating myocardium and sudden cardiac death[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013, 304(12):1697-1707.
- [5] Morrow JP, Katchman A, Son NH, et al. Mice with cardiac overexpression of peroxisome proliferator-activated receptor γ have impaired repolarization and spontaneous fatal ventricular arrhythmias [J]. Circulation, 2011, 124(25):2812-2821.
- [6] Nissen SE, Wolski K. Rosiglitazone revisited an updated meta-analysis of risk for myocardial infarction and cardiovascular mortality[J]. Arch Intern Med, 2010, 170(14):1191-1201.
- [7] Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia[J]. Cardiovasc Res, 1988, 22(9):656-665.
- [8] Mehrabi MR, 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.
- [9] Bilal HS, Chaofeng Ma, Saima Naqvi, et al. Effects of pioglitazone mediated activation of PPAR- γ on CIDEA and obesity related changes in mice[J]. PLoS One, 2014, 9(9):e106992.
- [10] 申琳, 王浩, 叶平. 吡格列酮对大鼠缺血/再灌注心肌过氧化物酶体增殖物受体 γ 辅激活因子 1α 表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(2):197-200.
- [11] 李兴暖, 龚 帆, 刘莉萍, 等. 粟米草提取物抗大鼠缺血再灌注致心律失常的作用[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(2):513-514.