

· 基础研究 ·

## 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 在应激致小鼠心肌损伤中的作用

高进辽, 王士雯\*, 李 泱, 蓝云峰, 方 舟, 刘 岩, 林 敏, 傅义程

(解放军总医院老年心血管病研究所, 北京 100853)

**【摘要】**目的 探讨应激致小鼠心肌损伤中过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) 的变化特征及吡格列酮的防护作用。方法 50只KM小鼠, 完全随机分为5组, 每组10只: 对照组、力竭游泳运动组、噪声组、复合刺激组、吡格列酮干预组(药物组)。造模成功后, 分别取血清和心肌组织, HE染色法观察心肌形态变化; ELISA检测法测定血清皮质酮(CORT)、肌钙蛋白I(TnI)和超氧化物歧化酶(SOD)含量; Real-time PCR检测心肌组织PPAR $\gamma$  mRNA表达, Western blot检测心肌组织PPAR $\gamma$ 的蛋白表达。结果 HE染色结果显示, 各组小鼠心肌形态变化不明显。与对照组相比, 三组应激源作用组血清CORT和TnI升高明显(CORT:  $106.75 \pm 33.96$ ,  $96.43 \pm 20.63$ ,  $173.17 \pm 22.28$ ; TnI:  $0.113 \pm 0.032$ ,  $0.077 \pm 0.034$ ,  $0.133 \pm 0.041$ ;  $P < 0.05$ ), SOD则显著下降( $103.36 \pm 10.43$ ,  $124.93 \pm 8.47$ ,  $97.16 \pm 17.30$ ), 心肌PPAR $\gamma$  mRNA和蛋白水平明显降低( $P < 0.05$ )。药物干预组与三组应激源作用组比较, 血清CORT和TnI显著降低( $P < 0.05$ ), SOD则显著升高, 心肌PPAR $\gamma$  mRNA和蛋白水平明显升高( $P < 0.05$ )。结论 应激可导致心肌微损伤; 应激条件下, PPAR $\gamma$ 在心肌的表达降低; 吡格列酮干预可使应激导致的心肌微损伤得到有效防护。

**【关键词】** 应激; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$ ; 超氧化物歧化酶; 肌钙蛋白I; 皮质酮

**【中图分类号】** R541

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-5403(2011)02-0172-05

## Effect of peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ on the myocardial injury caused by stress in mice

GAO Jinliao, WANG Shiwen\*, LI Yang, LAN Yunfeng, FANG Zhou, LIU Yan, LIN Min, FU Yicheng  
(Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

**【Abstract】** **Objective** To analyze the effect of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) on the myocardial injury caused by stress in mice and the preventive roles of pioglitazone. **Methods** Fifty mice were randomly assigned to control group, exhausted-swimming group, white noise group, exhausted-swimming plus white noise group, pioglitazone intervention group. The changes in myocardium structure were observed using HE staining. The serum levels of troponin I (TnI), corticosterone (CORT), superoxide dismutase (SOD) were determined by ELISA. The expression of PPAR $\gamma$  mRNA and protein was detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot respectively. **Results** HE staining showed normal myocardial structure in all groups. The serum levels of CORT and TnI were raised after different stress attack (CORT:  $106.75 \pm 33.96$ ,  $96.43 \pm 20.63$ ,  $173.17 \pm 22.28$ ; TnI:  $0.113 \pm 0.032$ ,  $0.077 \pm 0.034$ ,  $0.133 \pm 0.041$ ;  $P < 0.05$ ), while the level of SOD was reduced ( $103.36 \pm 10.43$ ,  $124.93 \pm 8.47$ ,  $97.16 \pm 17.30$ ;  $P < 0.05$ ). The expressions of PPAR $\gamma$  mRNA and protein were depressed in exhausted-swimming group, white noise group, and exhausted-swimming plus white noise group. In the pioglitazone group, the serum levels of TnI, CORT, and SOD and the expressions of PPAR $\gamma$  mRNA and protein were resumed. **Conclusion** Stress results in the myocardial injury. The expression of PPAR $\gamma$  in myocardial tissue was reduced under stress. Pioglitazone intervention can prevent myocardium against the injury caused by stress.

**【Key words】** stress; peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ; superoxide dismutase; corticosterone; troponin I

过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptors, PPAR $\gamma$ ) 是一个重要的细胞分化的转录因子, 调节着糖和脂质代谢, 也可以调节儿茶酚胺和肾素-血管紧张素系统, 还调控着血管紧张素 1型受体(AT1R)mRNA的表达。在血管与心肌组织均有表达, 参与调节炎症、细胞凋亡、

平滑肌迁移与增殖、动脉粥样硬化等病理过程<sup>[1-4]</sup>, PPAR $\gamma$ 是细胞炎症和缺血反应的重要调节因子, 在调节心肌氧化还原反应平衡中起关键作用, 是保持心脏结构和功能完整不可或缺的部分<sup>[5]</sup>。目前国内对外对PPAR $\gamma$ 在心脏中作用的研究主要是针对其激活后对氧化应激导致的心脏炎症、动脉粥样硬化、高

血压、糖尿病心肌病等保护作用。然而,过度应激状态下PPAR $\gamma$ 在心脏中的作用及表达如何尚鲜有报道。本研究旨在通过建立应激动物模型,探讨应激致心肌损伤的特点及其作用机制,为应激环境下心血管疾病的防护提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

RNA 抽提试剂盒、oligo-(dT)、M-MLV Reverse Transcriptase、BioEasy SYBR Green I Real Time PCR Kit Manual, 以上均购自尚柏生物医学(北京)有限公司; Ribonuclease Inhibitor(Takara D2310A); Line-gene 荧光定量 PCR 检测系统(杭州博日科技有限公司)、台式高速冷冻离心机 TGL-16(湘仪离心机)、DYY-7C 型电泳仪(北京六一仪器厂)、DYCP-31D 型水平式电泳槽(北京宾达英创科技有限公司)、凝胶成像系统(上海韵涵生物科技有限公司)、紫外分光光度计 UV-2000(尤尼柯(上海)仪器有限公司)、转膜仪(J-MAX)。

### 1.2 实验动物及分组

无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)雄性KM小鼠50只,体质量25~30 g,由解放军总医院实验动物中心提供。完全随机分为5组,每组10只,分别为:对照组、力竭游泳运动组、噪声组、力竭游泳运动+噪声组(复合刺激组)、吡格列酮干预组(药物组)。

### 1.3 模型建立

1.3.1 力竭游泳运动组 依据 Thomas 实验<sup>[6]</sup>,通过反复力竭游泳运动建立运动应激致心肌微损伤的实验动物模型。小鼠尾部负重3%体质量,1次/d,共14 d,每周休息一天,于最后一次力竭游泳运动后即刻取材。力竭标准<sup>[6]</sup>:连续沉入水中超过10 s,捞出后置于平面不能完成翻身反射;在相对短时间内力竭的小鼠,将其捞出休息5 min后,再继续游泳运动,每次游泳时间不少于2 h。

1.3.2 噪声组 将大鼠置于100 dB 的白噪声(功率谱密度在整个领域内均匀分布的噪声,含各种噪声)环境下,每天4 h,共14 d,白噪声由计算机控制给出<sup>[7]</sup>。于最后一次噪声结束后即刻取材。

1.3.3 复合刺激组 力竭游泳运动和白噪声两种应激源连续作用于小鼠。小鼠每天暴露于白噪声中4 h后,进行力竭游泳运动,标准同力竭游泳运动组。于最后一次力竭运动结束后即刻取材。

1.3.4 药物组 应激源实施同复合刺激组。每天吡

格列酮 10 mg/kg 灌胃,其余四组小鼠每天定时以等量的生理盐水灌胃。于最后一次力竭运动结束后即刻取材。

1.3.5 对照组 与实验组小鼠相同条件下饲养14 d后处死取材。

### 1.4 标本检测

1.4.1 HE 染色观察心肌组织形态的变化 取适量心肌组织,按照常规病理组织学方法制备心肌石蜡标本,采用 HE 染色法观察应激小鼠心肌形态的改变。

1.4.2 ELISA方法检测血清指标 包括检测的血清指标为皮质酮(corticosterone, CORT)、肌钙蛋白I(troponin I, TnI)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)。摘眼球取血法取血1 ml,3000 r/min离心10 min,血清于-20℃冰箱冻存备用。小鼠CORT和TnI试剂盒均购自美国RB公司,货号分别为:2B356和2B790, SOD试剂盒购自南京建成生物公司,实验操作严格按照试剂盒要求进行。

1.4.3 Real-time PCR 检测心肌组织 PPAR $\gamma$  mRNA 的水平 采用 Primer express 3.0 PCR 引物设计软件设计引物序列。Mus actin (NM\_007393; 263 bp)为上游:5'-GAGACCTTCAACACCCAGC-3'; 下游:5'-ATGTCACGCACGATTTC-3'; Mus PPAR $\gamma$  (NM\_001127330; 129 bp)为上游:5'-GACCTCAGGCAGATCGTCACA-3'; 下游:5'-GGTGGGACTTCTCTGCTAATACAA-3'。取各组小鼠心肌组织100 mg,在液氮中磨碎,加入1 ml裂解液RL研磨,用匀浆仪进行匀浆处理,采用北京尚柏 RNA 提取试剂盒(离心柱型)严格按照说明书要求进行 RNA 提取。在 Microtube 管中配制模板 RNA/引物混合液,全量<15  $\mu$ l,70℃保温5 min后迅速在冰上急冷2 min以上,离心数秒钟使模板 RNA/引物的变性溶液聚集于 Microtube 管底部,然后在 Microtube 管中配制反转录反应液,42℃保温2 h,95℃保温15 min后冰上冷却,得到 cDNA 溶液。按照以下条件进行扩增和荧光信号收集:95℃预孵育2 min,95℃ 20 s,58℃ 25 s,72℃ 30 s,共45个循环,95℃ 20 s。重复实验3次。

1.4.4 Western blot 检测心肌组织 PPAR $\gamma$  的蛋白表达 一抗选用抗 PPAR $\gamma$  的山羊多克隆抗体,二抗选用辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 IgG 抗体。取心肌组织约20 mg,加入400  $\mu$ l蛋白裂解液,用玻璃研磨器于冰上匀浆,11000 g 离心10 min,取上清液严格按照试剂盒说明书进行蛋白质定量,12%丙烯酰胺凝胶电泳,每泳道上样量为80  $\mu$ g总蛋白,湿转法把丙

烯酰胺凝胶中的蛋白质转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉封闭、抗体孵育, ECL显色, 采用LabWorks软件对图像进行灰度分析。

### 1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件对所有数据进行统计学处理, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单

因素方差分析, 组间两两比较采用  $q$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 心肌组织形态学观察

光镜下见各组心肌形态无显著变化(图 1)。

图 1 心肌组织形态学观察 (HE ×400)

A: 对照组; B: 运动+噪声组; C: 运动组; D: 药物组; E: 噪声组

### 2.2 血清检测结果

与对照组相比, 噪声组、运动+噪声组的血清 CORT 水平均有显著性升高( $P < 0.05$ ), 运动组的血清 CORT 水平虽然有升高趋势, 但是无统计学意义( $P > 0.05$ ); 运动组和运动+噪声组的血清 TnI 水平均有显著性升高( $P < 0.05$ ), 而噪声组虽然有升高的趋势, 但是无统计学意义( $P > 0.05$ ); 运动组、噪声组和运动+噪声组的血清 SOD 水平均有显著性降低( $P < 0.05$ )。与运动组相比, 运动+噪声组血清 CORT、TnI 水平均有显著性升高( $P < 0.05$ ), SOD 水平则显著降低( $P < 0.05$ )。与噪声组相比, 运动组和运动+噪声组的血清 CORT、TnI 均显著升高( $P < 0.05$ ), 血清 SOD 水平均显著降低( $P < 0.05$ )。药物组血清 CORT 水平较运动组、噪声组与运动+噪声组均有显著性降低( $P < 0.05$ ); 药物组血清 TnI 水平较运动组和运动+噪声组明显降低( $P < 0.05$ ), 与噪声组相比, 有降低的趋势, 但是无统计学意义( $P > 0.05$ ); 药物组较运动组和运动+噪声组的 SOD 水平有明显升高( $P < 0.05$ ), 较噪声组有升高趋势, 但变化不显著( $P > 0.05$ ; 表 1)。

表 1 血清指标检测结果 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别 ( $\mu\text{g/L}$ )	CORT	TnI( $\mu\text{g/L}$ )	SOD(u/ml)
对照组	63 ± 31	0.074 ± 0.023	139 ± 11
运动组	107 ± 34 <sup>ΔΔ</sup>	0.113 ± 0.032 <sup>*Δ</sup>	103 ± 10 <sup>*Δ</sup>
噪声组	96 ± 21 <sup>*</sup>	0.077 ± 0.034	125 ± 8 <sup>*</sup>
运动+噪声组	173 ± 22 <sup>*#Δ</sup>	0.133 ± 0.041 <sup>*#Δ</sup>	97 ± 17 <sup>*#Δ</sup>
药物组	86 ± 38 <sup>#ΔΔ</sup>	0.075 ± 0.032 <sup>#Δ</sup>	130 ± 10 <sup>#Δ</sup>

注: CORT: 皮质酮; TnI: 肌钙蛋白 I; SOD: 超氧化物歧化酶。与对照组比较, <sup>\*</sup> $P < 0.05$ ; 与运动组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与噪声组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ; 与运动+噪声组比较, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$

### 2.3 Real-time RT-PCR 检测心肌组织 PPAR $\gamma$ mRNA 的水平

与对照组相比, 运动组和运动+噪声组的心肌 PPAR $\gamma$  mRNA 明显降低( $P < 0.05$ ), 噪声组较对照组有降低的趋势, 但是无统计学意义( $P > 0.05$ ); 与运动组比较, 运动+噪声组表达显著降低( $P < 0.05$ ); 与噪声组比较, 运动组和运动+噪声组的心肌 PPAR $\gamma$  mRNA 表达明显降低( $P < 0.05$ ); 药物组心肌 PPAR $\gamma$  mRNA 表达显著高于运动组和运动+噪声组( $P < 0.05$ ), 与噪声组相比, 则差异不显著( $P > 0.05$ ; 图 2)。

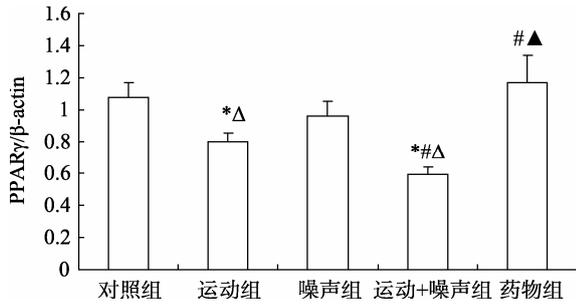


图2 Real-time RT-PCR 检测心肌 PPARγ mRNA 相对定量数据 (n=3)

与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与运动组比较, # $P < 0.05$ ; 与噪声组比较, Δ $P < 0.05$ ; 与运动+噪声组比较, ▲ $P < 0.05$

### 2.4 Western blot 检测心肌组织 PPARγ 蛋白的表达

与对照组比较, 运动组、噪声组和运动+噪声组的心肌 PPARγ 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ); 与运动组比较, 运动+噪声组的心肌 PPARγ 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ ); 与噪声组比较, 运动组和运动+噪声组均显著降低( $P < 0.05$ ); 药物组与运动组、噪声组和运动+噪声组分别比较, 其心肌 PPARγ 蛋白表达均有显著升高( $P < 0.05$ ; 图3)。

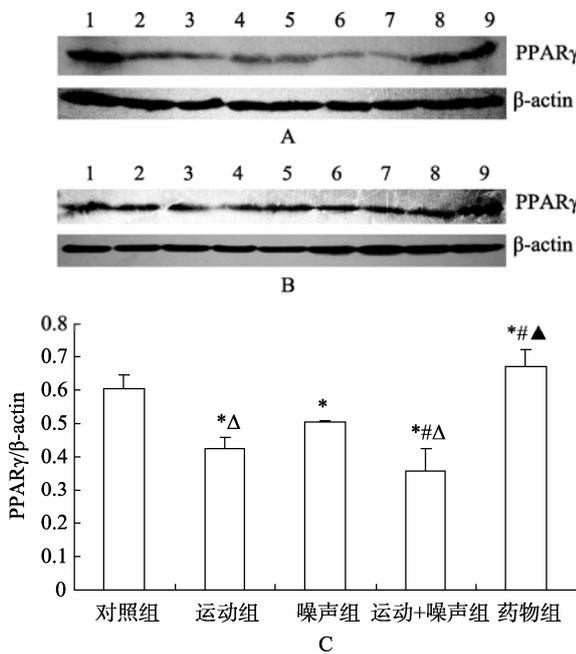


图3 Western blot 检测心肌组织 PPARγ 蛋白表达 (n=3)

A,B: 电泳图。A:1: 对照组; 2, 3: 运动组; 4, 5: 噪声组; 6, 7: 运动+噪声组; 8, 9: 药物组; B: 1, 2: 对照组; 3, 7: 运动组; 4: 噪声组; 5, 8: 运动+噪声组; 6, 9: 药物组。C: 灰度扫描图。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与运动组比较, # $P < 0.05$ ; 与噪声组比较, Δ $P < 0.05$ ; 与运动+噪声组比较, ▲ $P < 0.05$

### 3 讨论

本研究结果显示, 力竭游泳运动、白噪声刺激及复合刺激后, 小鼠心肌HE染色均未见心肌形态明

显变化; 但是血清检测结果表明, 三种应激源刺激后, 血清TnI和CORT水平较对照组明显升高( $P < 0.05$ ), 表明应激致心肌微损伤的实验动物模型建模成功。同时, 复合刺激后, 血清TnI和CORT水平较单纯力竭游泳运动和自噪声刺激后均明显升高( $P < 0.05$ ), 力竭游泳运动后, 血清TnI和CORT水平较自噪声刺激显著升高( $P < 0.05$ )。这表明, 小鼠在复合刺激后, 应激程度重于单纯的力竭游泳运动和自噪声刺激所致的应激, 力竭游泳运动所致的应激重于自噪声所致的应激。同时, 心肌损伤的程度随应激强度的增加而趋于严重。

大量研究表明, 应激条件下机体需氧量增加, 心肌细胞的需氧量也随之增加, 容易引起冠状动脉供血不足, 使心肌细胞缺血缺氧, 从而诱发大量活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)产生, 使抗氧化酶SOD被大量消耗, 氧化系统和抗氧化系统的动态平衡遭到破坏, 从而导致组织损伤。还有研究证实<sup>[8]</sup>, 氧化应激是导致心血管系统结构、功能异常的重要原因之一, 氧化应激以及在氧化应激过程中产生的ROS 与多种心血管疾病的发生发展有着密切关系<sup>[9,10]</sup>。Ding等<sup>[5]</sup>发现, 小鼠心肌的PPARγ表达缺陷可引起心肌SOD<sub>2</sub>表达下调, 细胞内自由基增加, 心肌线粒体氧化应激, 而氧化应激可进一步引起心肌的氧化应激损伤, 导致心肌形态及心功能改变。Zhao等<sup>[11]</sup>利用神经元PPARγ基因敲除小鼠在脑部的研究得出与上述研究相似的结论。本研究显示, 力竭游泳运动、白噪声刺激及复合刺激后, 小鼠心肌PPARγ的mRNA和蛋白表达较对照组均显著降低( $P < 0.05$ ), 且组间方差分析表明, 复合刺激后, 小鼠心肌PPARγ的mRNA和蛋白表达较力竭游泳运动和自噪声刺激均显著降低( $P < 0.05$ ), 力竭游泳运动后, 小鼠心肌PPARγ的mRNA和蛋白表达较自噪声刺激后显著降低( $P < 0.05$ ); 三种应激源刺激后, 血清SOD水平显著降低。这表明应激条件下, 小鼠心肌损伤的可能机制为PPARγ下调, 进而使SOD活性降低, 诱发大量的ROS产生, 加重心肌的氧化应激。同时, 机体动员各方面的机制来对应激作用, 导致ROS产生和清除失衡, 并在体内大量“堆积”, 从而引发广泛的损伤效应。

研究发现, 吡格列酮是PPARγ的体外激动剂, PPARγ被激活后, 通过不同的信号途径对心脏有一定的保护作用<sup>[12]</sup>。本研究采用吡格列酮干预复合刺

激后的动物模型,发现吡格列酮干预后,复合刺激所致的心肌应激性微损伤较之前有明显的恢复( $P < 0.05$ ),这为防治应激性心肌损伤及应激性心血管疾病,提供了理论依据。

综上所述,力竭游泳运动应激、白噪声应激及复合刺激均可导致心肌的微损伤,应激程度越重,损伤的程度越重,且这种损伤主要表现在分子水平,心肌的结构并未出现明显改变,其机制可能是应激时,心肌缺血缺氧,能量代谢异常,PPAR $\gamma$ 表达下调,导致心肌氧化应激加重,从而引发各种心血管疾病的发生。PPAR $\gamma$ 体外激动剂吡格列酮干预能使应激性心肌损伤快速恢复,这为今后研究应激性心血管疾病的防护措施提供了有效的理论依据。

#### 【参考文献】

- [1] Waki H, Yamauchi T, Kadowaki T. Recent advances in PPAR $\gamma$  research[J]. Nippon Rinsho, 2010, 68(2): 181-188.
- [2] Fliegner D, Westermann D, Riad A, et al. Up-regulation of PPAR $\gamma$  in myocardial infarction[J]. Eur J Heart Fail, 2008, 10(1): 30-38.
- [3] Son NH, Park TS, Yamashita H, et al. Cardiomyocyte expression of PPAR $\gamma$  leads to cardiac dysfunction in mice[J]. J Clin Invest, 2007, 117(10): 2791-2801.
- [4] Amoruso A, Gunella G, Rondano E, et al. Tobacco smoke affects expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in monocyte/macrophages of patients with coronary heart disease[J]. Br J Pharmacol, 2009, 158(5): 1276-1284.
- [5] Ding G, Fu M, Qin Q, et al. Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage[J]. Cardiovasc Res, 2007, 76(2): 269-279.
- [6] Thomas DP, Marshall KI. Effects of repeated exhaustive exercise on myocardial subcellular membrane structures[J]. Int J Sports Med, 1988, 9(4): 257-260.
- [7] 余晓俊, 吴铭权, 崔博, 等. 白噪声暴露致豚鼠心脏功能损伤作用[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(12): 1481-1483.
- [8] Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature molecular and cellular mechanisms[J]. Hypertension, 2003, 42(6): 1075-1081.
- [9] Bassenge E, Schneider HT, Daiber A. Oxidative stress and cardiovascular diseases[J]. Dtsch Med Wochenschr, 2005, 130(50): 2904-2909.
- [10] Gunneth CA, Lund DD, McDowell AK, et al. Mechanisms of inducible nitric oxide synthase-mediated vascular dysfunction[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(8): 1617-1622.
- [11] Zhao X, Strong R, Zhang J, et al. Neuronal PPAR $\gamma$  deficiency increases susceptibility to brain damage after cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 2009, 29(19): 6186-6195.
- [12] Liu HR, Tao L, Gao E, et al. Anti-apoptotic effects of rosiglitazone in hypercholesterolemic rabbits subjected to myocardial ischemia and reperfusion[J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(1): 135-144.

## · 消 息 ·

### 《中华老年多器官疾病杂志》征稿启事

《中华老年多器官疾病杂志》是由中国人民解放军总医院主管、解放军总医院老年心血管病研究所主办的医学学术期刊。本刊创办于 2002 年,由王士雯院士任总编辑。本刊是国内外唯一的一本反映老年多器官疾病的期刊,主要交流老年心血管疾病,尤其是老年心血管疾病合并其他疾病,老年两个以上器官疾病及其他老年多发疾病的诊治经验与发病机制的研究成果。开设的栏目有述评、综述、临床研究、基础研究等。

本刊现热忱欢迎从事心脏病学及其相关领域的专家学者踊跃投稿,我们真诚期待您的关注和参与。

地址: 100853 北京市复兴路 28 号,解放军总医院老年心血管病研究所

100088 北京市西城区德胜门外大街 83 号德胜国际中心 B 座 301 室,北京中科期刊出版有限公司

联系人: 王雪萍、任开环

电话: 010-66936756; 010-59790736-8087

传真: 010-59790736-8092

电子邮箱: mode@mail.sciencep.com

在线投稿: <http://www.mode301.cn/ch/author/login.aspx>