

## 心肌梗死后大鼠心肌脂肪酸氧化酶基因表达下调

胡 琴, 吴 强<sup>1</sup>, 耿昭华, 李隆贵

(中国人民解放军第三军医大学新桥医院心内科, 重庆市 400037; 1. 贵州省人民医院心内科, 贵州省贵阳市 550002)

[关键词] 分子生物学; 心肌梗死后大鼠心肌脂肪酸氧化酶基因表达下调; 聚合酶链反应; 心室重塑; 过氧化物酶体增殖剂活化受体  $\alpha$ ; 肌型肉碱棕榈酰转移酶; 中链酰基辅酶 A 脱氢酶

[摘要] 观察结扎左冠状动脉前降支复制的心肌梗死大鼠模型术后 2、4 和 8 周的血流动力学、心室重塑指标及梗死周围 4 mm 的心肌组织肌型肉碱棕榈酰转移酶、中链酰基辅酶 A 脱氢酶和过氧化物酶体增殖剂活化受体  $\alpha$  基因表达的变化, 以探讨无或伴有心力衰竭的大鼠心肌梗死后左心室重塑与局部脂肪酸氧化酶基因表达的关系。术后 2 周右室即出现肥厚, 与假手术组比较, 梗死周围的心肌组织肌型肉碱棕榈酰转移酶、中链酰基辅酶 A 脱氢酶和过氧化物酶体增殖剂活化受体  $\alpha$  mRNA 表达下调(分别为 27%、35% 和 20%,  $P < 0.05$ ); 8 周时大鼠出现明显心力衰竭, 左心室略有肥厚, 上述基因表达比 2 周时显著下调(分别为 52%、60% 和 44%,  $P < 0.05$ )。以上表明心肌梗死后大鼠从代偿性重塑到心力衰竭的发展过程中均存在脂肪酸氧化酶基因表达下调; 过氧化物酶体增殖剂活化受体  $\alpha$  在心肌梗死后心肌脂肪酸氧化酶基因的表达中可能起重要的调控作用。

[中图分类号] R34

[文献标识码] A

### Molecular Mechanism of Postinfarction in Rats Associated with Downregulation of Genes of Fatty Acid Metabolism in the Peri-Infarction Region

HU Qin, WU Qiang, GENG Zhao-Hua, and LI Long-Gui

(Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\alpha$ ; Muscle Carnitine Palmitoyl-transferase I; Medium Chain Acyl-CoA Dehydrogenase; Polymerase Chain Reaction; Ventricular Remodeling

[ABSTRACT] **Aim** To determine whether left ventricular remodeling with or without onset heart failure after myocardial infarction is associated with the regional changes in the gene expression of fatty acid metabolism. **Methods** Myocardial infarction(MI) was induced in rats by ligation of the left anterior descending coronary artery. Hemodynamics, ventricular remodeling parameters were investigated in the experimental and sham-operated animals(SH) at 2, 4, 8 week after operation. In infarcted hearts, the peri-infarction region(4 mm zone surrounding the region) were separated for gene expression analysis of the rate-limiting enzyme[muscle carnitine palmitoyltransferase I (M-CPT-I)], key enzyme[medium chain Acyl-CoA dehydrogenase(MCAD)] of fatty acid oxidation and nuclear transcription factor [peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$ (PPAR  $\alpha$ )]. **Results** At 2 weeks after LAD ligation, when right ventricular hypertrophy was present without signs of heart failure, mRNA expression of M-CPT-I, MCAD and PPAR  $\alpha$  was reduced in the peri-infarction regions[27%, 35% and 20% respectively in MI<sub>2w</sub> vs SH; ( $P < 0.05$ )]. Until 8 weeks, left ventricle displayed a little hypertrophy with heart failure, there was significant downregulation in mRNA expression of M-CPT-I, MCAD and PPAR  $\alpha$  in the peri-infarction regions [reduced 52%, 60% and 44% respectively in MI<sub>8w</sub>/SH<sub>8w</sub> vs MI<sub>2w</sub>/SH<sub>2w</sub>; ( $P < 0.05$ )]. **Conclusion** In rats with MI, progression from compensated remodeling to heart failure is associated with gene expression downregulation of fatty acid oxidation in the peri-infarction region. Downregulation of PPAR  $\alpha$  mRNA displays that PPAR  $\alpha$  may be a very important factor that regulates cardiac fatty acid oxidation in rats subsequent to myocardial infarction.

大量研究表明压力和容量负荷性左心室重塑与心肌糖原分解、葡萄糖氧化增加和脂肪酸氧化减少紧密相关, 这表现为能量代谢调控基因表达模式的“胚胎型再演”<sup>[1]</sup>。虽然左心室重塑是心肌梗死(myocardial infarction, MI)后存活心肌的主要特点, 但心

肌梗死后心室重塑的细胞和分子学特点明显不同于单纯的压力或容量负荷。心肌梗死后左心室结构的改变最早与急性压力负荷和缺血有关, 随之发生代偿性肥厚, 最后呈进行性扩张。Remondino 等<sup>[2]</sup>发现心肌梗死后 8 周大鼠左心室心肌组织葡萄糖氧化增加, 中链酰基辅酶 A 脱氢酶(medium chain Acyl-CoA dehydrogenase, MCAD)的表达减少。那么在心肌梗死后尚未出现明显心力衰竭前是否存在脂肪酸氧化酶基因表达下调? 在梗死周围的局部心肌组织能量代谢是否也有上述变化? 其机制如何? 本文通过检测

[收稿日期] 2002-07-23

[修回日期] 2002-12-20

[作者简介] 胡琴, 女, 1973 年出生, 四川省南充市人, 讲师, 博士研究生, 联系电话: 023-65224004, E-mail: Annetehu@sina.com。李隆贵, 男, 1946 年出生, 教授, 博士研究生导师。

心肌梗死后 2、4 和 8 周大鼠梗死周围 4 mm 处心肌组织线粒体脂肪酸摄入限速酶——肌型肉碱棕榈酰转移酶(muscle carnitine palmitoyltransferase-I, M-CPT-I)、脂肪酸氧化关键酶——MCAD 和核转录因子——过氧化物酶体增殖剂活化受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator activated receptors  $\alpha$ , PPAR  $\alpha$ ) 基因的表达变化,以阐明上述问题。

## 1 材料和方法

### 1.1 建立大鼠心肌梗死模型

心肌梗死组选择纯种雄性 Wistar 大鼠 27 只(中国人民解放军第三军医大学实验动物中心提供),体重  $195.7 \pm 21.1$  g。参阅 Johnes 等<sup>[3]</sup>方法,开胸暴露心脏,于左心耳下缘约 1 mm 处结扎左冠状动脉前降支,然后逐层关胸,立即行胸外按压直至大鼠呼吸恢复。术后予青霉素 20 万单位腹腔注射连续 3 日,喂饲普通大颗粒饲料。

### 1.2 实验动物分组

将 MI 大鼠随机分成 2 周组(MI<sub>2w</sub>组,  $n = 7$ )、4 周组(MI<sub>4w</sub>组,  $n = 10$ )和 8 周组(MI<sub>8w</sub>组,  $n = 10$ )。假手术组(sham operation, SH 组)大鼠 27 只,体重  $196.3 \pm 25.2$  g,在心脏相同部位穿线但不结扎前降支,余同上,将 SH 组大鼠随机分成假手术 2 周组(SH<sub>2w</sub>组,  $n = 9$ )、假手术 4 周组(SH<sub>4w</sub>组,  $n = 8$ )和假手术 8 周组(SH<sub>8w</sub>组,  $n = 10$ )。

### 1.3 测定血流动力学指标及留取心肌组织标本

术后观察期满,分别将各组大鼠用 3% 氨基甲酸乙酯溶液(0.1 mL/kg)腹腔注射麻醉后,分离右颈动脉和静脉,分别插管,应用 RM-6000 型 8 道生理记录仪(日本 Nihon Kohden 公司生产)记录主动脉和左心室压力曲线。测量心率(heart rate, HR)、主动脉收缩压(systolic aortic pressure, SAP)、主动脉舒张压(diastolic aortic pressure, DAP)、左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)和左心室压力上升或下降最大速度( $\pm dp/dt_{max}$ )。完成压力曲线记录后立即开胸取出心脏,用预冷的生理盐水灌注冲洗至冲洗液无红色,清洁滤纸吸干水份后分别称取左心室(包括室间隔)和右心室(不包括室间隔)湿重。计算左、右心室湿重/体重(mg/g)即为左心室心肌肥厚指数(left ventricular myocardial hypertrophy index, LVMI)和右心室心肌肥厚指数(right ventricular myocardial hypertrophy index, RVMI)。取离梗死处 4 mm 范围的心室肌(MI<sub>2w</sub>组、MI<sub>4w</sub>组、MI<sub>8w</sub>组)和假手术各

组左心室心肌冻存于液氮中。全过程于冰浴中进行。除外 MI 面积小于 20% 者。

### 1.4 逆转录—聚合酶链反应

采用异硫氰酸胍—苯酚—氯仿一步法,按 Trizol 试剂盒(上海生工)说明书提取心肌组织 RNA。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳法鉴定 RNA 的完整性。紫外分光光度法确定 RNA 的量和纯度。取总 RNA 2.5  $\mu$ g 逆转录合成 cDNA,然后按照分子克隆进行半定量聚合酶链反应。寡聚核苷酸引物的合成(上海生工)分别为 PPAR  $\alpha$  (509 bp) sense: 5'-AAGCC/ATCTT/CACGA/TGCTG-3', antisense: 5'-TCAGA/GGTCC/CTGAA/CAGTG-3'; M-CPT-I (690 bp) sense: 5'-TATGT/GAGGA/TGCTG/CTTCC-3', antisense: 5'-CTCGG/AGAGC/TAAGC/TTGTC-3'; MCAD (458 bp) sense: 5'-AGCCT/TCACC/GGATT/CATCG-3', antisense: 5'-TAGCG/AGCTG/GTTGG/CAATA/TG-3';  $\beta$ -actin (764 bp) sense: 5'-TTGTA/ACCAA/CTGGG/ACCAT/ATGG-3', antisense: 5'-GATCT/TGATC/TTCAT/GGTGC/TAGG-3'。PPAR  $\alpha$  反应条件: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 40 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min; M-CPT-I 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 42 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min; MCAD 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 内参  $\beta$ -actin 反应条件同 MCAD。反应结束后,各取聚合酶链反应产物 4  $\mu$ L 进行 1.2% 琼脂糖电泳,并用 Gel Doc 2000 凝胶图像分析仪扫描,聚合酶链反应产物量以吸光度值  $\times$  面积表示,扩增片段与  $\beta$ -actin 的吸光度值(absorbent values, A)作为目的片段 mRNA 的相对含量,并比较 MI<sub>2w</sub>/SH<sub>2w</sub>、MI<sub>4w</sub>/SH<sub>4w</sub> 和 MI<sub>8w</sub>/SH<sub>8w</sub> mRNA 相对含量的比值。

### 1.5 统计学分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较用方差分析,两两比较用 Newman-Keuls 检验。以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 大鼠一般情况

MI<sub>2w</sub>、MI<sub>4w</sub> 和 MI<sub>8w</sub> 组大鼠均有不同程度的紫绀、活动和进食减少,部分大鼠出现肢端水肿。其中 MI<sub>2w</sub> 组仅 2 只大鼠出现肢端轻度水肿,MI<sub>8w</sub> 组所有大鼠均出现严重的水肿、进食明显减少。

### 2.2 大鼠血流动力学和心室重塑指标的改变

MI<sub>8w</sub> 组的 LVMI 大于 SH<sub>2w</sub> 组,而 MI<sub>2w</sub> 组和 MI<sub>4w</sub> 组

与同期 SH 组比较无统计学差异, MI<sub>4w</sub> 组和 MI<sub>8w</sub> 组 RVMI 大于同期 SH 组和 MI<sub>2w</sub> 组。与相应的 SH 组比较, MI 后 4 周开始 LVEDP 明显增高, MAP 和 + dp/

dt<sub>max</sub> 显著降低, 而 MI<sub>2w</sub> 组 dp/ - dt<sub>max</sub> 则低于 SH<sub>2w</sub> 组 (表 1, Table 1)。

表 1. 大鼠血流动力学和心室重塑指标的改变( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Changes of hemodynamics and ventricular remodeling parameters in rats( $\bar{x} \pm s$ )

分组(n)	LVM1 (mg/g)	RVMI (mg/g)	心率 (b/min)	LVEDP (mmHg)	左心室收缩压 (mmHg)	+ dp/ dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	- dp/ dt <sub>max</sub> (mmHg/s)	平均动脉压 (mmHg)
SH <sub>2w</sub> (9)	2.54 ± 1.36	0.60 ± 0.07	433 ± 24	4.0 ± 0.9	139.2 ± 15.2	5 914 ± 597	4 261 ± 476 <sup>a</sup>	119.8 ± 11.9
MI <sub>2w</sub> (7)	2.52 ± 0.20	0.68 ± 0.07 <sup>bc</sup>	436 ± 24	4.3 ± 1.1 <sup>bc</sup>	133.6 ± 12.2 <sup>c</sup>	5 253 ± 527 <sup>bc</sup>	3 584 ± 311 <sup>bc</sup>	112.3 ± 9.9
SH <sub>4w</sub> (8)	2.58 ± 0.23	0.58 ± 0.09 <sup>a</sup>	429 ± 26	4.6 ± 0.7 <sup>a</sup>	137.5 ± 15.0	5 755 ± 538 <sup>a</sup>	4 388 ± 391 <sup>a</sup>	116.0 ± 15.4 <sup>a</sup>
MI <sub>4w</sub> (10)	2.63 ± 0.11	0.84 ± 0.10 <sup>c</sup>	440 ± 19	9.5 ± 1.8 <sup>c</sup>	123.3 ± 12.5	4 494 ± 522 <sup>c</sup>	3 160 ± 312	99.2 ± 10.9
SH <sub>8w</sub> (10)	2.47 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.06 <sup>a</sup>	426 ± 17	4.6 ± 1.2 <sup>a</sup>	142.0 ± 11.9 <sup>a</sup>	5 848 ± 609 <sup>a</sup>	4 289 ± 298 <sup>a</sup>	125.9 ± 11.4 <sup>a</sup>
MI <sub>8w</sub> (10)	2.64 ± 0.11	1.04 ± 0.08	432 ± 21	20.6 ± 3.1	118.3 ± 10.8	3 861 ± 363	2 836 ± 295	102.0 ± 9.5

$P < 0.05$ , a: 与 MI 组比较; b: 与 MI<sub>4w</sub> 组比较; c: 与 MI<sub>8w</sub> 组比较。 LVM1: 左心室心肌肥厚指数; RVMI: 右心室心肌肥厚指数; LVEDP: 左心室舒张末压; + dp/ dt<sub>max</sub>: 左心室压力上升最大速度; - dp/ dt<sub>max</sub>: 左心室压力下降最大速度; SH: 假手术组; MI: 心肌梗死组。

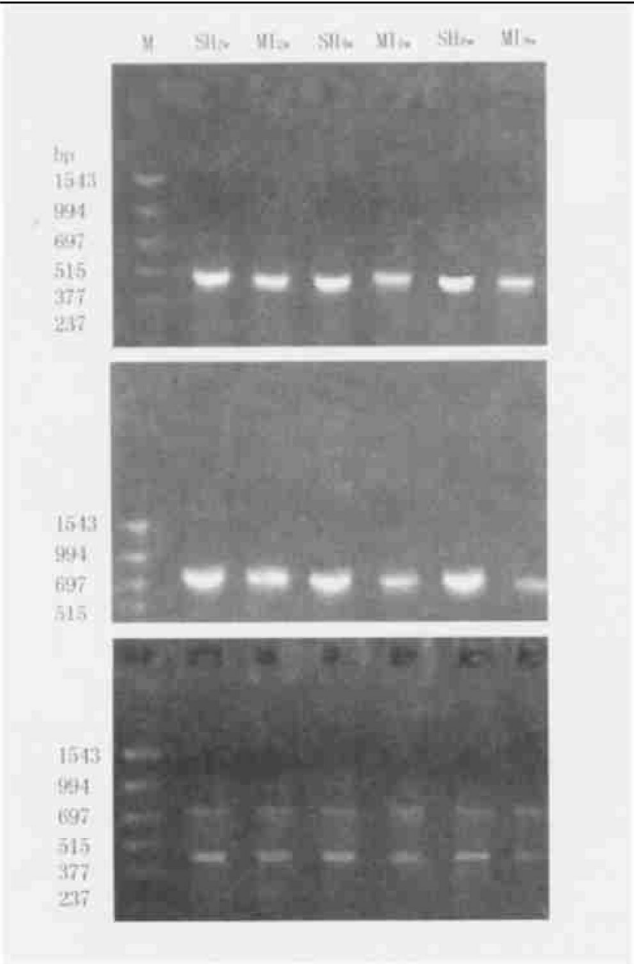


图 1. 心肌梗死后大鼠梗死周围 4 mm 处心肌过氧化物酶体增殖剂活化受体  $\alpha$ 、肌型肉碱棕榈酰转移酶和中链酰基辅酶 A 脱氢酶的聚合酶链反应扩增产物

Figure 1. PCR products of PPAR  $\alpha$ , M-CPT-I and MCAD in the peri-infarction regions (4 mm zone surrounding the region) of rats subsequent to MI

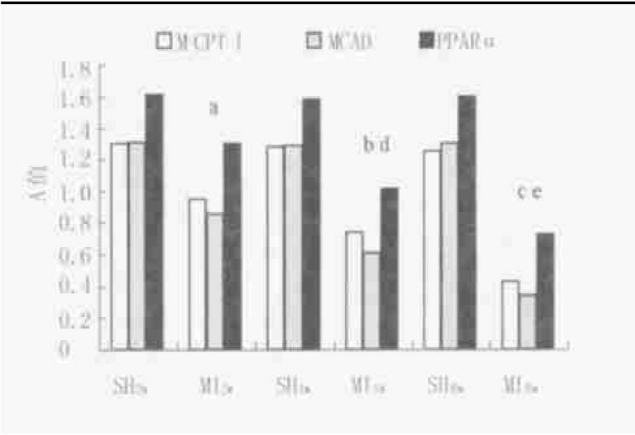


图 2. 各组大鼠心肌过氧化物酶体增殖剂活化受体  $\alpha$ 、肌型肉碱棕榈酰转移酶和中链酰基辅酶 A 脱氢酶 mRNA 表达变化  $P < 0.05$ , a: 与 SH<sub>2w</sub> 比较, b: 与 SH<sub>4w</sub> 比较, c: 与 SH<sub>8w</sub> 比较, d: 与 MI<sub>2w</sub> 比较; e: 与 MI<sub>4w</sub> 比较。

Figure 2. Changes of PPAR  $\alpha$ , M-CPT-I and MCAD mRNA expression in respective MI group (expressed as percentage of the mean of corresponding values of sham-operated rats)

2.3 聚合酶链反应扩增结果及其 mRNA 表达变化

心肌过氧化物酶体增殖剂活化受体  $\alpha$ 、M-CPT-I 和 MCAD 扩增片段长度分别为 509 bp、690 bp 和 458 bp, 与预期设计的目的片段大小相同 (图 1, Figure 1)。MI<sub>2w</sub> 组 M-CPT-I、MCAD 和 PPAR  $\alpha$  mRNA 的表达比 SH<sub>2w</sub> 组分别降低 27%、35% 和 20% ( $P < 0.05$ )。MI<sub>4w</sub>/SH<sub>4w</sub> 上述指标 mRNA 相对含量比值较 MI<sub>2w</sub>/SH<sub>2w</sub> 分别下降 21%、27% 和 20% ( $P < 0.05$ )。MI<sub>8w</sub>/SH<sub>8w</sub> 较 MI<sub>2w</sub>/SH<sub>2w</sub> 分别下降 52%、60% 和 44% ( $P < 0.05$ , 图 2, Figure 2)。

### 3 讨论

近年研究证实: 已知血流动力学负荷引发的成年心肌肥厚与能量代谢底物及代谢调控蛋白表达的转换有关<sup>[4]</sup>。M-CPT-I 是线粒体摄取脂肪酸的限速酶, MCAD 是中链脂肪酸( $C_4$ - $C_{12}$ )  $\beta$  氧化第一步的关键酶。中链脂肪酸不仅来源于饮食, 还是特长链、长链脂肪酸  $\beta$  氧化的产物。虽然许多调控蛋白参与脂肪酸的  $\beta$  氧化, 但 M-CPT-I 和 MCAD 在脂肪酸  $\beta$  氧化中有重要作用。本实验选用的这 2 个指标可以直接反应脂肪酸氧化相关基因的表达变化, 这与近年来的相关研究是一致的。本实验发现: 左冠状动脉前降支结扎术后 2 周, 大鼠尚未出现明显水肿、呼吸困难和食欲下降等症状前, 离梗死处 4 mm 范围的心室肌 M-CPT-I 和 MCAD 的基因表达已减少, 到术后 8 周所有大鼠均出现严重水肿等心力衰竭症状时, 上述指标减少更显著。这表明在心肌梗死后左心室重塑的整个过程中, 无论有无严重心力衰竭症状, 梗死周围局部心肌组织都存在脂肪酸代谢相关基因表达的下调, 而且心力衰竭越严重, 心肌脂肪酸氧化障碍越明显。本实验证实了梗死周围局部心肌组织存在脂肪酸氧化酶基因表达下调, 这一点是以前许多学者未予重视的。但抑制心肌梗死后大鼠梗死局部脂肪酸氧化的信号通路尚不完全清楚。

有研究证明 M-CPT-I 和 MCAD 基因启动子上的核反应元件-1(NRRE-1) 能够结合大量的转录因子(包括 PPAR  $\alpha$  和 Sp1) 而激活转录。PPAR  $\alpha$  是核激素受体超家族的新成员, 协调性地控制出生后心肌线粒体大部分编码脂肪酸氧化酶核基因的表达。PPAR  $\alpha$  主要分布在线粒体脂肪酸氧化效率高的组织如: 心、肝、棕色脂肪组织和颤搐缓慢的骨骼肌等。活化的 PPAR  $\alpha$  能够增加与心肌细胞脂肪酸利用密切相关的 3 个主要步骤的基因表达, 包括: ①脂肪酸的转运和酯化; ②线粒体对脂肪酸的摄入; ③线粒体和过氧化物酶体的  $\beta$  氧化。因此 PPAR  $\alpha$  是成年心肌脂质和能量代谢的重要调控子<sup>[5]</sup>。Sack 等<sup>[6]</sup>发现肥厚心肌 PPAR  $\alpha$  能够与 Sp1 竞争性地结合在 NRRE-

1 上。以此为背景, 本实验观察了 PPAR  $\alpha$  的基因表达, 发现心肌梗死后大鼠梗死局部心肌组织 PPAR  $\alpha$  的基因表达下调, 并随着心功能的恶化而显著。这一结果表明 PPAR  $\alpha$  活性下调可能参与了心肌梗死后大鼠心肌重塑及梗死局部心肌组织脂肪酸代谢调控蛋白的表达变化。总之, 无论有无明显心力衰竭症状, 心肌梗死后大鼠梗死局部心肌组织脂肪酸氧化酶基因表达均下调。这说明能量代谢转换并非心室肥厚或心力衰竭的特有表现, 它贯穿于心肌梗死后大鼠左心室重塑的始终。已知脂肪酸氧化能够增加心肌能量的产生, 但消耗大量的氧; 而葡萄糖代谢则相反(高 P/O 比值)。心肌梗死后大鼠心肌缺血、缺氧, 下调脂肪酸的氧化能够减少心肌耗氧, 增加心肌对缺血和缺氧的耐受性, 阻止凋亡, 可能具有一定的心肌保护作用。但它同时减少心脏能量的供给, 这是否促进了心力衰竭的发生和发展, 或者仅仅是一伴随现象? 目前对心肌梗死的研究主要集中在氧化损伤和血脂代谢异常等方面<sup>[7,8]</sup>, 而对其能量代谢紊乱的分子机制研究尚未见大量报道, 这些问题尚需深入研究。

### [参考文献]

- [1] Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol*, 1997, **80** (Suppl 1): 15L-25L.
- [2] Remondino A, Rosenblatt-Velin N, Montessuit C, Tardy I, Papageorgiou I, Dor-saz PA, et al. Altered expression of proteins of metabolic regulation during re-modeling of the left ventricle after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, **32** (11): 2 025-034.
- [3] Johns T, Olson B. Experimental myocardial infarction. *Ann Surg*, 1954, **140** (4): 675-682.
- [4] Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA, Kelly DP. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation*, 1996, **94** (11): 2 837-842.
- [5] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*, 1999, **20** (1): 649-688.
- [6] Sack MN, Dish DL, Rockman HA, Kelly DP. A role for Sp and nuclear receptors in a cardiac hypertrophic growth program. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (20): 6 438-443.
- [7] 刘和俊, 汪太平, 李 芹, 史学功. 急性心肌梗死患者氧化损伤及抗氧化酶活性. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 319-321.
- [8] 金 炜, 陆元善, 李为真, 徐英华, 郑明芳. 急性心肌梗死患者载脂蛋白 E 基因多态性及其与血脂代谢的关系. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 51-53.

(此文编辑 朱雯霞)