

[文章编号] 1007-3949(2004)12-03-0313-04

·实验研究·

吡格列酮对压力负荷引起大鼠心肌肥厚的抑制作用

张 铨¹, 叶 平¹, 陈国林²

(1. 中国人民解放军总医院老年心内科, 北京 100853; 2. 国防大学第一门诊部, 北京 100091)

[关键词] 病理学与病理生理学; 吡格列酮; 过氧化体增殖物激活型受体; 心肌肥厚; 炎症细胞因子; 脑钠尿肽; 压力负荷

[摘要] 利用在体动物实验方法观察吡格列酮对大鼠心肌肥厚和心肌炎症细胞因子表达的影响, 探讨该药影响心肌肥厚可能涉及的作用机制。通过不完全结扎大鼠腹主动脉引起压力负荷增加, 造成左心室心肌肥厚的模型。从术前 1 周起用灌胃器经口给予吡格列酮[20 mg/(kg·d)]直至术后 4 周。处死动物, 取心脏称重后计算心脏重/体重比值, 将部分心脏组织制成石蜡切片, 测量左心室壁厚度和心肌细胞的平均直径, 其余心脏组织用于检测心肌细胞中脑钠尿肽、白细胞介素 4、白细胞介素 1 β 和心调素 1 的 mRNA 表达。结果发现, 心肌肥厚大鼠的心肌中炎症细胞因子白细胞介素 1 β 、心调素 1 和心肌肥厚标志基因脑钠尿肽 mRNA 表达显著增加, 应用吡格列酮能够明显减少心肌肥厚大鼠上述分子 mRNA 表达; 与心肌肥厚对照组相比, 心肌肥厚用药组大鼠的心脏重/体重比值(4.77 \pm 0.25 mg/g 比 4.23 \pm 0.22 mg/g, $P < 0.05$)、心肌细胞平均直径(11.6 \pm 1.3 μ m 比 10.1 \pm 1.1 μ m, $P < 0.05$)和左心室壁厚度均明显降低。此结果提示, 吡格列酮可能通过抑制炎症细胞因子的表达来抑制压力负荷增加引起的心肌肥厚。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Pioglitazone Inhibit Cardiac Hypertrophy Induced by Pressure Overload in Rats

ZHANG Cheng¹, YE Ping¹, and CHEN Guo-Lin²

(1. General Hospital of PLA, Beijing, 100853; the First Clinic of the National Defence University, Beijing, 100091)

[KEYWORD] Pioglitazone; Peroxisome Proliferator-Activated Receptor; Hypertrophy; Cytokine; Pressure Overload

[ABSTRACT] Aim To investigate the antihypertrophic effects of pioglitazone and its effects on proinflammatory cytokines.

Methods Cardiac hypertrophy was produced by abdominal aortic banding (AB). Pioglitazone (20mg/kg⁻¹ day⁻¹) was given orally 1 week before operation and continued till 4 weeks after operation, then the rats were killed, part of the heart was used for measurements of left ventricular wall thickness, and the myocyte diameter, the other part of the heart was used for testing the mRNA expression of proinflammatory cytokines.Result The mRNA expression of proinflammation cytokines Interleukin-1 β , Cardiotropin-1 and brain natriuretic peptide (a molecular marker for cardiac hypertrophy) was markedly enhanced in the hypertrophic myocardium of AB rats. Compared with control group, treatment of AB rats with pioglitazone significantly inhibited the mRNA expression of the gene mentioned above, and reduced the increases in the heart weight-to-body weight ratio (4.77 \pm 0.25 mg/g vs 4.23 \pm 0.22 mg/g, $P < 0.05$), myocyte diameter (11.61 \pm 1.34 μ m vs 10.07 \pm 1.07 μ m, $P < 0.05$) and left ventricular wall thickness. Conclusion Pioglitazone may attenuate cardiac hypertrophy through inhibition of proinflammatory cytokines.

临床上高血压病等压力负荷增加引起的左心室肥厚较常见, 关于压力负荷刺激转变为心肌表现型改变方面的研究较多, 而炎症细胞因子与心肌肥厚之间的关系是新的研究热点^[1-3]。炎症细胞因子分为致炎细胞因子与抑炎细胞因子, 前者以肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 和白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 为代表, 心调素 1 (cardiotropin-1, CT-1) 是 IL-

6 家族的成员之一; 后者以白细胞介素 4 (Interleukin-4, IL-4) 为代表。脑钠尿肽 (brain natriuretic peptide, BNP) mRNA 是心肌肥厚的标志基因, 当心肌肥厚形成时, 其 mRNA 表达增加, 因此, 许多研究者将 BNP 作为心肌肥厚的分子学标准。吡格列酮是体内过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPAR γ) 高亲和力的配体, 是临床上治疗糖尿病的新药。新近的研究表明吡格列酮可以调节炎症反应, 抑制炎症细胞因子的表达^[4]。但关于吡格列酮对心肌肥厚的影响少见报道。本研究通过不完全结扎大鼠腹主动脉引起压力负荷增加, 造成心肌肥厚的模型, 并观察吡格列酮治疗后心脏的病理学和心肌中炎症细胞因子表达的改变, 探讨吡格列酮是否可以通过抗炎途径抑制左心室心肌肥

[收稿日期] 2003-09-21 [修回日期] 2004-05-13

[作者简介] 张铨, 硕士研究生, 医师, 研究方向为脂代谢紊乱与心血管疾病。叶平, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 老年心内科副主任, 研究方向为脂代谢紊乱与心血管疾病, 联系电话 010-66937593, E-mail 为 yeqing@sina.com。陈国林, 主治医师。

厚。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只 (体重 180 ~ 200 g), 由解放军总医院实验动物中心提供, 随机分成 5 组, 每组 8 只, 分别为心肌肥厚药物组、心肌肥厚对照组、假手术药物组、假手术对照组和空白对照组。

1.2 心肌肥厚模型的制作

大鼠经 10% 水合氯醛 (0.3 mL/kg) 腹腔麻醉后行剑突下正中切口, 于双侧肾动脉分支近心端处将腹主动脉与直径为 0.6 mm 的钢丝结扎在一起后, 抽出钢丝, 缝合切口, 术后饲养 4 周。心肌肥厚药物组和心肌肥厚对照组按上述方法手术, 假手术药物组和假手术对照组只分离腹主动脉不予结扎。

1.3 给药方法

心肌肥厚药物组和假手术药物组自术前 1 周起用灌胃器经口给予吡格列酮 [20 mg/(kg·d)] 直至术后 4 周, 吡格列酮由北京大洋药业有限公司提供。心肌肥厚对照组和假手术对照组在同样的时间灌 0.9 生理盐水直至术后 4 周。

1.4 取材

处死动物前称体重, 处死后取心脏称重, 计算心脏重与体重比值, 在距心尖与心底等距离处横行切断心脏, 心底端置 10 甲醛固定, 进行病理学实验; 心尖端置液氮保存, 进行分子生物学实验。

1.5 病理学检测

将甲醛固定的心脏组织做成石蜡切片, 经苏木精-伊红染色后拍照, 用 Image-Pro Plus 图象分析软件测量左心室前壁、侧壁、后壁和室间隔的厚度, 在显微镜下放大 40 倍后再拍照, 每张切片随机选取 10 个视野, 每个视野选 10 个细胞, 用 Image-Pro Plus 软件测每个细胞的面积, 取平均值后计算出其等效面积圆的直径, 即为心肌细胞平均直径^[5]。

1.6 心肌钠尿酸、白细胞介素 1 β 、心调素和白细胞介素 4 的表达测定

使用 Promega 公司的 Z5110 总 RNA 提取试剂盒提取心肌总 RNA, 用无 RNA 酶水充分溶解 RNA 沉淀, 以紫外分光光度计测定 260 nm 和 280 nm 的吸光度值并估计样品量和纯度。以 2.5 μ g 总 RNA 为模板反转录生成 40 μ L 的 cDNA 产物。然后以大鼠核糖体磷蛋白 PO (36B4) 为内参照, 聚合酶链反应体系扩增待测基因, 所用引物见表 1。IL-4 扩增条

件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 经 30 次循环后, 继续以 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。其余的均按以下条件扩增: 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 经 30 次循环后, 继续以 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 0.5 mg/L) 电泳, 紫外光下凝胶成像分析系统记录结果, 待测基因 mRNA 相对表达量以其扩增带光密度值与相应内参照扩增带光密度值的比值表示。

表 1. 逆转录聚合酶链反应所用引物序列

基因	引物序列	产物长度 (bp)
BNP 正义链	5'-TTTTCTTAATCTGTGCCG-3'	387
反义链	5'-AGAGCTGGGAAAGAAGAGC-3'	
IL-1 β 正义链	5'-TTCITTTCCITCAATCTTGAAGAAG-3'	362
反义链	5'-TCCATCTTCTTCTTTGGGTATGTT-3'	
CT-1 正义链	5'-TCTATGGCGAGTGGGTGAGC-3'	340
反义链	5'-AGCAAGCAAGCAAAGAAAGA-3'	
IL-4 正义链	5'-AACACCACGGAGAACGAGCTCATC-3'	152
反义链	5'-AGTGAGTTCAGACCCGCTGACACCT-3'	
内参照正义链	5'-GTACCTGCTCAGAACACCCG-3'	240
反义链	5'-CCTCTGGGCTGTAGATGCTG-3'	

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 STATA 软件包行单因素方差分析, t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心脏的病理学检测结果

心肌肥厚对照组大鼠结扎腹主动脉 4 周后, 其左心室壁厚度、心肌细胞平均直径、心脏重/体重比值较假手术药物组、假手术对照组和空白对照组明显增加, 而心肌肥厚药物组的上述指标较心肌肥厚对照组有显著改善 ($P < 0.05$)。详细资料见表 2 (Table 2)。

2.2 大鼠心肌炎性细胞因子的表达

假手术药物组、假手术对照组和空白对照组大鼠的心肌无 IL-1 β 、CT-1 和 BNP 的 mRNA 表达, 心肌肥厚对照组大鼠心肌中 IL-1 β 、CT-1 和 BNP 的 mRNA 表达增加, 心肌肥厚药物组大鼠心肌上述基因的表达较心肌肥厚对照组明显下降 ($P < 0.05$), 各组 IL-4 的 mRNA 的表达无显著差异。详细资料见表 3 和图 1 (Table 3 and Figure 1)。

表 2. 各组大鼠心脏的病理学指标

Table 2. Cardiac pathological data of each group

分 组	心脏重与体重 比(mg/g)	室间隔厚度 (mm)	左室前壁 厚度(mm)	左室后壁 厚度(mm)	左室侧壁 厚度(mm)	心肌细胞 平均直径(μm)
空白对照组	3.62 \pm 0.33	2.14 \pm 0.36	3.65 \pm 0.20	2.76 \pm 0.23	2.77 \pm 0.33	9.34 \pm 1.13
假手术对照组	3.75 \pm 0.30	2.11 \pm 0.45	3.48 \pm 0.42	2.83 \pm 0.36	2.84 \pm 0.36	9.11 \pm 1.35
假手术药物组	3.53 \pm 0.28	2.17 \pm 0.49	3.56 \pm 0.56	2.85 \pm 0.41	2.67 \pm 0.35	9.59 \pm 0.89
心肌肥厚对照组	4.77 \pm 0.25 ^a	2.63 \pm 0.56	4.20 \pm 0.44 ^a	3.52 \pm 0.31 ^a	3.61 \pm 0.48 ^a	11.61 \pm 1.34 ^a
心肌肥厚药物组	4.23 \pm 0.22 ^{ab}	2.39 \pm 0.51	3.98 \pm 0.21 ^{ab}	3.34 \pm 0.57 ^a	3.18 \pm 0.28 ^{ab}	10.07 \pm 1.07 ^{ab}

a: $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b: $P < 0.05$, 与心肌肥厚对照组比较

表 3. 各组大鼠心肌炎性细胞因子和 BNP 的 mRNA 表达

Table 3. The mRNA expression of proinflammatory cytokines and BNP in the myocardium of rats

分 组	白细胞介素 1β	心调素 1	脑钠尿肽	白细胞介素 4
空白对照组	-	-	-	0.519 \pm 0.082
假手术对照组	-	-	-	0.479 \pm 0.067
假手术药物组	-	-	-	0.467 \pm 0.059
心肌肥厚对照组	0.210 \pm 0.047	0.310 \pm 0.056	0.812 \pm 0.090	0.504 \pm 0.071
心肌肥厚药物组	0.151 \pm 0.042 ^b	0.163 \pm 0.029 ^b	0.554 \pm 0.143 ^b	0.492 \pm 0.063

b: $P < 0.05$, 与心肌肥厚对照组比较。

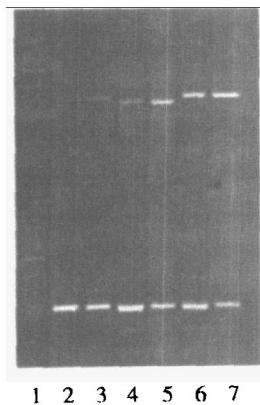


图 1. 心肌肥厚组大鼠心肌白细胞介素 1β 、心调素 1 和脑钠尿肽的 mRNA 表达 1 为 Marker, 2、4 和 6 分别为心肌肥厚药物组的 IL- 1β 、CT-1 和 BNP, 3、5 和 7 分别为心肌肥厚对照组的 IL- 1β 、CT-1 和 BNP。

Figure 1. The IL- 1β , CT-1 and BNP mRNA expression in the myocardium of rats

3 讨论

对压力负荷增加引起的心肌肥厚的众多研究中,炎性细胞因子得到越来越多的重视,例如 IL- 1β 在体外可以诱导心肌细胞肥大,并使心肌肥厚的标志基因 BNP 表达增加^[6],CT-1 部分通过调节血管紧

张素 II 的表达量引起心肌肥厚^[7]。本实验结果表明:正常大鼠心脏无致炎细胞因子表达,当压力负荷增加引起心肌肥厚时,致炎细胞因子 IL- 1β 和 CT-1 的 mRNA 表达增加。因此致炎细胞因子在压力负荷增加引起心肌肥厚的病理发展过程中,发挥了一定作用。核因子 κB (nuclear factor- κB)、转录信号转导和激活因子 (signal transducers and activation of transcription, STAT) 和活化蛋白 1 (activator protein-1, AP-1) 是调节炎症反应重要转录因子, IL- 1β 、IL-6 和 TNF α 等炎性细胞因子的基因转录都通过上述信号转导途径调控。吡格列酮是噻唑烷二酮类胰岛素增敏剂,是 PPAR γ 的特异性激活剂,能够通过激活 PPAR γ 进而抑制核因子 κB 、AP-1 和 STAT 等信号转导途径发挥抗炎作用^[8]。

体外实验发现,吡格列酮能够抑制血管紧张素 II 诱导的大鼠心肌细胞肥大,并降低心房钠尿肽和骨骼肌 α 肌动蛋白的基因表达^[9]。本研究通过压力负荷增加诱导大鼠左室肥厚,经吡格列酮治疗后,心肌中致炎细胞因子 IL- 1β 、CT-1 和心肌肥厚的标志基因 BNP 的 mRNA 表达明显降低,而且其心脏重/体重比值,左室壁厚度和心肌细胞平均直径也显著低于心肌肥厚对照组。由此可见,吡格列酮在转录水平抑制炎性细胞因子 IL- 1β 和 CT-1 的表达,进而抑制压力负荷增加引起的心肌肥厚。白细胞介素 4

是最具代表性的抑炎细胞因子之一,能抑制炎症反应,本实验中各组实验动物白细胞介素 4 mRNA 均有表达,但无统计学意义,说明吡格列酮可能仅对致炎细胞因子有抑制作用,而此作用未涉及到增强抗炎因子白细胞介素 4 的表达。

目前,吡格列酮在临床上主要用于糖尿病的治疗,能够增加胰岛素敏感性,降低胰岛素抵抗。糖尿病常并发糖尿病性心肌病,表现为左心室肥厚,射血分数降低和心功能下降^[10]。胰岛素抵抗不仅是非胰岛素依赖型糖尿病的发病机制,而且与心肌肥厚的发生和发展密切相关^[11]。临床研究表明:非胰岛素依赖型糖尿病患者的左心室肥厚程度与血液的胰岛素浓度呈正相关,高胰岛素血症可能是此类患者心肌肥厚的决定因素之一,因此,在治疗方面减轻胰岛素抵抗与降低血糖同样重要,能够延缓糖尿病患者左心室肥厚的发展,降低心血管事件的发病率^[9]。

吡格列酮对糖尿病的疗效已经得到临床上充分地肯定,关于吡格列酮的抗炎作用以及对心肌肥厚的作用等研究大多还只是在动物实验阶段,一些具体问题,将随着研究的深入逐步得到解决。

[参考文献]

- [1] 项美香, 吕俊升. 内皮素在自发性高血压大鼠心肌肥厚中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 1998, 6 (1): 46-49
- [2] 刘健, 何作云, 王培勇. 心肌肥厚大鼠细胞核内蛋白激酶和蛋白磷酸酶活性. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (3): 206-209
- [3] 彭水平, 江时森, 陈锐华, 李俊春. 血管紧张素 II 1 型受体拮抗剂与醛固酮受体拮抗剂对逆转高血压大鼠心肌重塑的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (5): 408-410
- [4] Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 1998, 391 (6662): 82-86
- [5] 翟为溶, 张锦生. 现代组织化学的原理及应用. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1998; 87-89
- [6] Harada E, Nakagawa O, Yoshimura M, Harada M, Nakagawa M, Mizuno Y, et al. Effect of interleukin-1 β on cardiac hypertrophy and production of natriuretic peptides in rat cardiocyte culture. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31 (11): 1 997-006
- [7] Fukuzawa J, Boaz GW, Hunt RA, Hunt RA, Shimizu N, Karoor V, et al. Cardiotrophin-1 increases angiotensinogen mRNA in rat cardiac myocytes through STAT3. *Hypertension*, 2000, 35 (6): 1 191-196
- [8] Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol*, 2001, 169: 453-459
- [9] Asakawa M, Takano H, Nagai T, Uozumi H, Hasegawa H, Kubota N, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo. *Circulation*, 2002, 105 (10): 1 240-246
- [10] Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O, Grady MJ, Lee ET, Welty TK, et al. Impact of diabetes on cardiac structure and function. *Circulation*, 2000, 101 (19): 2 271-276
- [11] Watanabe K, Sekiya M, Tsuruoka T, Funada J, Kameoka H. Effect of insulin resistance on left ventricular hypertrophy and dysfunction in essential hypertension. *J Hypertens*, 1999, 17 (8): 1 153-160
- [12] Hirayama H, Sugano M, Abe N, Yonesuechi H, Makino N. Determination of left ventricular mass by echocardiography in normotensive diabetic patients. *Jpn Circ J*, 2000, 64 (12): 921-924

(此文编辑 胡必利)